

Nachweis biologisch aktiver Wachstumsfaktoren mit Hilfe von Rezeptorproteinen

Von der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von
Birgit von Tiedemann
aus Landsberg am Lech

1.Referentin : Frau PD Dr. U. Bilitewski

2. Referent : Herr Prof. Dr. W.-D. Deckwer

eingereicht : 27.3.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.11.2000

Druckjahr: 2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

von Tiedemann, B., Günther, A., Sztajer, H., Weich, H., Röckl, W., Bilitewski, U.: Assays for monitoring growth factor activity (Poster), FEBS Special Meeting Cell Signalling Mechanisms, Amsterdam (1997)

von Tiedemann, B., Bilitewski, U.: Affinity sensors for the determination of growth factors (Poster), Biosensors'98 World Congress, Berlin (1998)

von Tiedemann, B., Johanson, M., Weich, H., Bilitewski, U.: Nachweis biologisch aktiver Wachstumsfaktoren mittels Rezeptoren (Poster), Deutsches Biosensor Symposium, München (1999)

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ursula Bilitewski für die Betreuung meiner Arbeit, für stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Entfaltung.

Herrn Prof. Wolf-Dieter Deckwer für die freundliche Übernahme des Korreferats .

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Herbert Weich für die hervorragende Zusammenarbeit, seine Diskussionsbereitschaft und viele wertvolle Informationen zu VEGF und seinen Rezeptoren.

Herrn Dr. Wolfgang Röckl danke ich für die Einarbeitung in die Herstellung und Reinigung von rekombinanten Proteinen.

Herrn Carsten Hornig für die ein oder andere sFLT-1 Spende sowie die kritische Durchsicht von Teilen des Manuskriptes.

Frau Malin Johanson danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Frau Tanja Richter, Herrn Adrian Klein und Herrn Dr. Dirk Kuhlmeier danke ich neben ihrer Diskussionsbereitschaft für die gemeinsame Zeit in der GBF.

Frau Dr. Ingrid Rohm und Herrn Dr. Matthias Stiene danke ich für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. Joop van den Heuvel und Frau Katja Eckert für die gute und interessante Zusammenarbeit, Frau PD Dr. Ursula Rinas für die Möglichkeit, im ihrem Laborarbeiten zu dürfen und Herrn Dr. Uwe Kärst für viele wertvolle Informationen.

Für die kritische Durchsicht von Manuskriptteilen danke ich Frau Sabine Marten, Frau Susanne Trappe, Frau Daniela Wenzel, Frau Carola Fortmann, Frau Dr. Inka Siegmund-Jürgens und Herrn Björn Henze.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Projektgruppe Biosensoren für ein gutes Arbeitsklima und vielen interessanten Diskussionen bei einer Tasse Tee danken.

Insbesondere möchten ich auch meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung danken.

I Einleitung

1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	3

II Theoretische Grundlagen

1 VEGF und seine Rezeptoren	4
1.1 VEGF	5
1.2 VEGF-Rezeptoren	7
2 Antikörper	9
3 Protein-Protein-Wechselwirkungen	12
4 Ligand-Bindungsassays	13
4.1 Allgemeines	13
4.2 Assayformate	14
4.2.1 Indirekte Assayformate auf der Mikrotiterplatte	16
4.2.2 BIAcore - ein direkter Affinitätssensor	21
4.2.2.1 Grundlagen des Meßprinzips	21
4.2.2.2 Messen mit dem BIAcore-System	24
4.2.3 Fließinjektionsanalyse (FIA)	26
4.2.3.1 Grundlagen	26
4.2.3.2 Aufbau des verwendeten FIA-Systems	27
4.2.3.3 Messen mit dem FIA-System	30
4.2.3.4 Herstellung der Konjugate und des biotinylierten Reaktors	32
4.2.3.4.1 Biotinylierung von Proteinen	32
4.2.3.4.2 Herstellung der Protein-POD-Konjugate	33
4.2.3.4.3 Herstellung eines Affinitätsreaktor mit biotinyliertem Trägermaterial	33
4.3 Auswertung	
4.3.1 Affinitätsbestimmung über das thermodynamische Gleichgewicht	35
4.3.2 Kinetische Untersuchungen	39
4.3.3 Auswertung und Charakterisierung der Rezeptorassays	44

III Material und Methoden

1 Material	45
1.1 Chemikalien	45
1.2 Wachstumsfaktoren und Rezeptoren	46
1.3 Antikörper	46
1.4 Hergestellte Konjugate	47
1.5 Medien	48
1.6 Zellen	48
1.7 Sonstige Substanzen	48
1.8 Puffer und Lösungen	49
1.9 Geräte und sonstige Materialien	53
2 Methoden	55
2.1 Herstellung und Reinigung verschiedener Proteine	55
2.1.1 Allgemeine Vorschrift zur Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Insektenzellen	55
2.1.1.1 Herstellung von sKDR	56
2.1.2 Reinigung von VEGF	57
2.1.3 Reinigung von sFLT-1	58
2.1.4 Reinigung von sKDR	59
2.2 Herstellung der verschiedenen Konjugate	61
2.2.1 Jodierung von VEGF	61
2.2.2 Peroxidase-Konjugate	62
2.2.3 Biotinylierung von VEGF	63
2.3 Gelelektrophorese	63
2.3.1 Gelelektrophorese am PhastSystem	64
2.3.2 Gelelektrophorese mit dem Mini-Protean II System	65
2.4 Western Blot	67
2.5 BCA(Bicinchoninic Acid)-Assay	69
2.6 Verschiedene Assayformate in der Mikrotiterplatte	70

2.6.1 Radioaktiver VEGF-Assay	70
2.6.2 Relida I - Sandwichformat	73
2.6.3 Relida II - Kompetitiven Format mit VEGF-POD	75
2.6.4 Relida III - Sandwichformat mit Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD	75
2.6.5 Quantikine Human VEGF Immunoassay von R&D-Systems	77
2.7 BIAcore-System	77
2.7.1 Kinetische Untersuchungen	78
2.7.2 Quantitative Analytik	79
2.8 Fließinjektionsanalyse	81
2.8.1 Silanisierung und Aktivierung des Glasträgers	81
2.8.2 Test der benötigten Konjugate	83
2.8.2 Vorbereitung und Ablauf der Messung	84
2.9 Ergänzende Arbeiten	85
2.9.1 Zellaassays	86
2.9.2 Fermentation von rhVEGF ₁₆₅ mit einem <i>Pichia</i> -MUT ^s -Stamm	86
 IV Ergebnisse und Diskussion	
1 Herstellung und Reinigung der rekombinanten Proteine	90
2 Vergleich von sFLT-1 und sKDR mit den Rezeptoren auf Zellen	92
2.1 Bestimmung der Affinität	93
2.1.1 Klassische Bindungsstudien auf Mikrotiterplatten	93
2.1.2 Untersuchungen mit dem BIAcore-System	96
2.1.3 Vergleich der Affinitätskonstanten	99
2.2 Bindung der physiologischen Liganden an die löslichen Rezeptoren	102
2.3 Direkter experimenteller Vergleich zwischen dem Zell- und dem Rezeptorassay	104
2.3.1 Vergleich bekannter Bindungspartner	105
2.3.2 Mögliche Inhibitoren der VEGF-Rezeptor-Bindung	110
2.3.3 Ergebnis der Vergleichsmessung	113

3 Rezeptorassays	114
3.1 Mikrotiterplattenassays	114
3.1.1 Kompetitiver Rezeptorassay	115
3.1.2 Rezeptorassay im Sandwichformat	116
3.2 Messungen mit dem BIAcore-System - einem optischen Affinitätssensor	130
3.3 Vergleich der verschiedenen Methoden	135
3.4 Einsatz der entwickelten Rezeptorassays für die Analyse von Realproben	137
4 Fließinjektionsanalyse (FIA)	145
 V Zusammenfassung	 151
 VI Literatur	 154

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
B	Baculovirus
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovines Serum Albumin</i>)
C	Celsius
CCD	Charged Coupled Device
CPG	controlled pore glass
CPM	counts per minute
deion	deionisiert
dest	destilliert
DMF	Dimethylformamid
E.c.	<i>E. Coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FCS	Fötales Kälberserum
FGF-9	Fibroblast Growth Factor-9
FIA	Fließinjektionsanalyse
FLT-1	<i>fms</i> -like tyrosine kinase receptor
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GOPS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
h	Stunde(n)
HBS	HEPES buffered saline
HPE-Puffer	High Performance ELISA Puffer
KDR	kinase domain region receptor
Kpi	Kaliumphosphat
Ig	Immunglobulin
L	Ligand
λ	Wellenlänge
min	Minute(n)

MVEC	Microvascular Endothelial Cell
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PlGF	Placenta Growth Factor
POD	Meerrettich-Peroxidase
R	Rezeptor
Relida	Rezeptor Ligand Interaktion Detektionsassay
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
rlu	relative light units
RT	Raumtemperatur
RU	Resonance Units
s	Sekunde(n)
sFLT-1	soluble FLT-1
sKDR	soluble KDR
SA	Streptavidin
SAM-POD	Peroxidase-markierter-Schaf-Anti-Maus-Antikörper
SPR	Oberflächen-Plasmonenresonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus

I Einleitung

1 Einleitung

Die biotechnologische Herstellung pharmazeutisch wirksamer Proteine und Substanzen gewinnt zunehmend an Bedeutung. Von besonderem Interesse sind dabei Wachstumsfaktoren, d.h. Proteine, die für die Regulierung des Zellwachstums verantwortlich sind. Über Wechselwirkungen mit ihren Rezeptoren lösen sie eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zu einer zellspezifischen Antwort führt. Störungen in diesem System sind die Ursache für eine Vielzahl von Erkrankungen. Die mitogenen Eigenschaften von Wachstumsfaktoren sind sehr spezifisch und beschränken sich auf einen Zelltyp.

Diese Spezifität ermöglicht den Einsatz der rekombinanten Proteine für verschiedene Zielsetzungen. So werden Wachstumsfaktoren direkt als Humantherapeutika oder zur Herstellung neutralisierender Antikörper für therapeutische Zwecke eingesetzt. Neutralisierende Antikörper sind in der Lage, die Rezeptor-Ligand-Bindung zu blockieren und damit bestimmte Signalwege zu unterbrechen (Campell 1991). Im industriellen Screening wird mit Wachstumsfaktoren und Rezeptoren nach Agonisten und Antagonisten von zellulären Reaktionen gesucht, um pharmazeutisch wirksame Substanzen zu finden. In der Forschung finden rekombinante Wachstumsfaktoren Verwendung bei der Untersuchung von zellulären Prozessen und den damit verbundenen Krankheiten.

Von großem wissenschaftlichen und therapeutischen Interesse sind insbesondere der angiogene Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) und seine Rezeptoren KDR und FLT-1. VEGF ist einer der Hauptregulatoren bei der physiologischen und der pathologischen Bildung von Blutgefäßen (Ferrara 1991, Connolly 1991, Neufeld 1999). Es ist der einzige Wachstumsfaktor, der nur auf Endothelzellen mitogen wirkt und an sämtlichen Angiogenese-Prozessen beteiligt ist (Risau 1997). Neben physiologischen Prozessen wie dem weiblichen Zyklus und der Wundheilung ist VEGF

auch von pathologischer Bedeutung bei der Bildung und Versorgung von Tumoren, Rheumatismus, Diabetes und der diabetischen Retinopathie (Ferrara 1997). Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern ist es bereits gelungen, das Wachstum bestimmter Tumore zu inhibieren (Kim 1993, Borgstrom 1996, Zhu 1998). Bei Erkrankungen, die auf örtlichen Durchblutungsstörungen beruhen, könnte VEGF direkt als positiver Regulator eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind Herzkranzgefäßerkrankungen und schlecht durchblutete Gliedmaßen, wie beispielsweise Raucherbeine. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, daß mit VEGF das Wachstum von Endothelzellen und die Bildung von Blutgefäßen in Organismen angeregt und die Durchblutung verbessert werden kann (Takeshita 1996, Harada 1996, Ferrara 1997, Ahrendt 1998).

Um rekombinantes VEGF für therapeutische bzw. wissenschaftliche Zwecke oder für ein Wirkstoff-Screening nutzen zu können, muß der Wachstumsfaktor in seiner biologisch aktiven Form und in großer Reinheit vorliegen. Die Produktion rekombinanter Proteine erfolgt mit unterschiedlichen Expressionssystemen. Je nach Wirtssystem, das für die Herstellung gewählt wurde, kann sich VEGF überwiegend in seiner biologisch aktiven oder in einer inaktiven Struktur befinden. Hinzu kommt, daß es während der Fermentation und Reinigung zu Aktivitätsverlusten kommen kann. Da aber die biologische Aktivität die Voraussetzung für die Verwendbarkeit ist, müssen die Proteine nach ihrer Herstellung daraufhin geprüft werden.

Bisher sind radioaktive Zellassays die Standardmethode zur Überprüfung der Qualität, d.h. der Aktivität, rekombinanter Proteine. Diese Assays sind teuer und aufwendig, da mit radioaktivem Material gearbeitet und die Zellen ständig kultiviert werden müssen. Erst drei bis vier Tage nachdem die Zellen auf die Zellkulturplatte gegeben wurden, kann der Assay durchgeführt werden. Für eine schnelle Kontrolle der Konzentration aktiver VEGF-Moleküle in Proben oder für eine on-line Überwachung von Kultivierungen sind die radioaktiven Zellassays ungeeignet. Hier wäre ein nicht-radioaktiver Assay von Vorteil, der schnell und einfach durchgeführt werden kann.

Da die Erkennung des Wachstumsfaktors im zellulären Assay über die VEGF-Rezeptoren FLT-1 und KDR erfolgt, wurde überlegt, ob es möglich ist, nur die Rezeptoren für den Nachweis von VEGF zu verwenden. In der Regel ist die Handhabung kompletter Rezeptormoleküle aufgrund ihrer komplexen Struktur sehr schwierig. Alle relevanten Informationen für die Erkennung und Bindung von Liganden befinden sich auf der extrazellulären Domäne der Rezeptoren (Barleon 1997, Davis-Smyth 1996, Cunningham 1997). Mit rekombinanten Technologien lassen sich die lösliche Rezeptorproteine sFLT-1 und sKDR herstellen, die ausschließlich aus dem extrazellulären Bereich der Rezeptoren bestehen (Kendall 1993, Roeckl 1998, Hornig 1999).

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob sich die löslichen Rezeptorproteine sFLT-1 und sKDR für den Nachweis von biologisch aktivem VEGF eignen und ob es möglich ist, mit sFLT-1 und sKDR einfache, nicht-radioaktive Nachweismethoden zu etablieren. Die vorliegende Arbeit läßt sich in die folgenden Teilschritte gliedern:

- Herstellung und Reinigung von VEGF und seinen löslichen Rezeptoren
- Untersuchung der Bindungseigenschaften der löslichen Rezeptoren
- Aufbau und Charakterisierung verschiedener Assayformate
- Anwendung der entwickelten Rezeptorassays

II Theoretische Grundlagen

1 VEGF und seine Rezeptoren

VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor) und seine Rezeptoren sind von großem wissenschaftlichem und therapeutischem Interesse, da sie bei der Blutgefäßbildung, in physiologischen und pathologischen Prozessen, eine bedeutende Rolle spielen. Über die Blutgefäße erfolgt die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Abfallsubstanzen. Die Ausbildung eines Gefäßsystems ist daher einer der ersten Prozesse von sich entwickelnden Embryonen. Dieser als Vaskulogenese bezeichnete Vorgang beinhaltet die *de novo* Differenzierung von Endothelzellen aus mesodermalen Vorläuferzellen und ihren Zusammenbau zu einem primären vaskulären Netzwerk. Dieser Prozeß findet nur zu Beginn der embryonalen Entwicklung statt. Die Bildung neuer Blutgefäße im Organismus durch Proliferation von Endothelzellen aus bereits existierenden Gefäßen heißt Angiogenese (Risau 1997, Ferrara 1995, Klagsbrun 1993).

VEGF ist ein potentes Endothelzellmitogen, daher unterliegt seine Expression im Organismus einer strikten Regulation. VEGF kann durch Cytokine wie beispielsweise TGF und IL-1 bis -6 induziert werden. Der Hauptfaktor der die Expression des VEGF-Genes induziert ist jedoch Hypoxie (Sauerstoffmangel im Gewebe). Über das Blut gelangt der Wachstumsfaktor zu den Endothelzellen und bindet dort an die Rezeptoren (Keyt 1996, Brekken 1998). Über die intrazellulären Tyrosin-Kinasen der Rezeptoren wird das Signal weiter geleitet und die Proliferation der Endothelzellen ausgelöst.

In gesunden Organismen findet Angiogenese während der embryonalen Entwicklung, im weiblichen Zyklus und der Wundheilung statt. Allerdings ist Angiogenese auch in eine Reihe pathologischer Prozesse, wie z.B. Tumorentwicklung, Rheumatismus, Diabetes oder diabetische Retinopathie, involviert (Folkman 1995, Ferrara 1997, Veikkola 1999)

1.1 VEGF

In den letzten Jahren sind eine Reihe neuer Mitglieder der VEGF-Familie gefunden worden. So gehören neben VEGF, auch VEGF-A genannt, und dem Placenta Wachstumsfaktor (PlGF) auch VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E zur Familie. Die verschiedenen Faktoren werden von unterschiedlichen Rezeptoren (Kap. II.1.2) erkannt und haben spezifische, sich teilweise überlappende Funktionen (Veikkola 1999, Eriksson 1999, Neufeld 1999, Olofson 1996, Joukov 1996, Yamada 1997, Meyer 1999). Das seit den achtziger Jahren bekannte VEGF bzw. die häufigste Isoform VEGF₁₆₅ ist aufgrund seiner Verbreitung und biologischen Funktionen das wichtigste Mitglied der VEGF-Familie (Senger 1983, Ferrara 1989).

Allen gemeinsam ist, daß sie homodimere Glykoproteine sind und acht charakteristisch angeordnete Cysteinreste enthalten, die zu einem bestimmten Cysteinknotenmotiv führen. Damit gehören sie, wie eine Reihe anderer mitogener Proteine, zur Familie der Cysteinknotenproteine (Sun 1995). VEGF ist wie alle Mitglieder dieser Familie nur in der dimeren Form biologisch aktiv (Pötgens 1994). Dabei sind beide Monomere antiparallel über zwei Disulfidbrücken verknüpft. Aminosäuresequenzen aus beiden Monomeren sind für die Rezeptorbindung notwendig (Abb. 1).

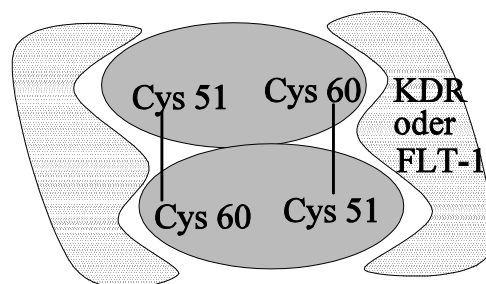


Abb. 1: Schematische Darstellung des dimeren VEGF-Moleküls und seine Bindung an die Rezeptoren (nach Neufeld 1999)

Die Bindung erfolgt überwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen (Keyt 1996, Wiesmann 1997, Muller 1997). Es wird vermutet, daß die Bindung der jeweiligen Rezeptoren an die anderen Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie ähnlich erfolgt (Veikkola 1999).

Alternatives Exon Splicing des VEGF Gens führt zu verschiedenen humanen Isoformen mit 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren pro Monomer (Ferrara 1991, Tischer 1991). Das VEGF Gen setzt sich aus 8 Exons zusammen. Die Exon 1 - 5 Domäne enthält die Information für die Rezeptorbindung und ist zusammen mit der Exon 8 Domäne in allen Varianten vorhanden (Keyt 1996). Die wichtigste und überwiegend vorkommende Isoform ist VEGF₁₆₅ (Houck 1992, Ferrara 1992). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur hinsichtlich ihrer Affinität zu Heparin bzw. der Zelloberfläche, ihres isoelektrischen Punktes und somit auch in ihrer Verfügbarkeit. So ist VEGF₁₂₁, die wichtigste Isoform nach VEGF₁₆₅, ein schwach saures und frei sekretiertes Protein ohne Affinität zu Heparin. Ihm fehlen im Vergleich zu den anderen Isoformen Exon 6 und 7 und somit die Bindedomänen für Heparin und zur Zellassoziaton (Tischer 1991, Park 1993).

Moleküle wie Heparine oder Heparansulfate befinden sich auf der Zelloberfläche und können die Rezeptor-Ligand-Interaktion beeinflussen (Kap. II.1.2). Mit steigender Größe der Isoformen nimmt die Heparinaffinität und die Basizität der Moleküle zu. VEGF₁₆₅ ist ein sekretiertes, basisches und heparinbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Ferrara 1989). Obwohl ihm ebenfalls die für die Zellassoziaton verantwortliche Exon 6 Domäne fehlt, ist ein Teil des Proteins aufgrund der vorhandenen Heparinaffinität auf der Zelloberfläche gebunden. VEGF₁₄₅ ähnelt VEGF₁₆₅ und ist ein relativ seltene Isoform. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ besitzen die Exon 6 und Exon 7 Domäne und liegen daher ausschließlich in gebundener Form vor (Park 1993). Durch Heparin oder Heparinaseaktivität kann es zur Freisetzung dieser Isoformen kommen (Houck 1992, Plouët 1997).

1.2 VEGF-Rezeptoren

Die hochaffinen VEGF-Rezeptoren FLT-1 (*fms*-like tyrosine kinase), KDR (kinase domain region) und FLT-4 gehören zur Familie der Klasse III Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, d.h. sie geben ihr Signal über Tyrosin-Kinasen an intrazelluläre Substanzen weiter. Da FLT-4 kein Bindungspartner von VEGF sondern von VEGF-C und -D ist, wird auf diesen Rezeptor hier nicht näher eingegangen. FLT-1 und KDR werden bis auf wenige Ausnahmen nur von Endothelzellen exprimiert (Neufeld 1999, Risau 1997). Die Rezeptorproteine sind 180-220 kDa schwer und bestehen aus einem extrazellulären Teil mit sieben Immunglobulin (Ig) ähnlichen Domänen, einer Transmembransequenz und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Sequenz, die durch eine Kinase-Insert-Domäne unterbrochen wird (Abb. 2).

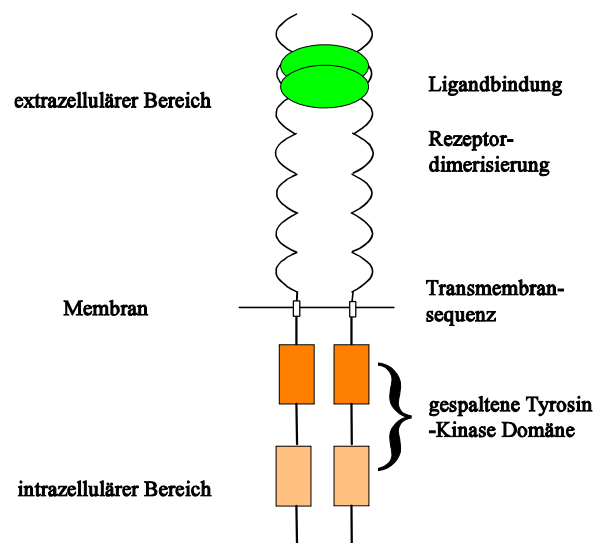


Abb. 2: Schematische Darstellung der Rezeptorstruktur und Bindung von VEGF. Der Ligand bindet im Bereich der zweiten Ig ähnlichen Domäne des Rezeptors und führt zur Dimerisierung von Rezeptorproteinen. Das Signal wird über die Tyrosin-Kinasen der intrazellulären Domäne und eine Signalkaskade weiter geleitet.

Bei der Bindung von VEGF kommt es zur Rezeptordimerisierung, der eine Trans-Autophosphorylierung intrazellulärer Kinasen an ihren Tyrosinresten folgt. Über die aktivierten Kinasen und eine Reihe von Substratmolekülen kommt es zu einer Signalkaskade, die schließlich zu einer spezifischen Zellantwort führt (Shibuya 1999). Eine Reihe von Untersuchungen haben gezeigt, daß die zweite Domäne für die Erkennung und Bindung von VEGF verantwortlich ist. Für eine hochaffine Bindung werden die ersten drei Domänen benötigt. Die vierte Domäne ist wichtig für die Rezeptordimerisierung (Barleon 1997, Davis-Smyth 1996). Ohne die Domänen eins und zwei ist die Bindung von PlGF an FLT-1 nicht möglich (Cunningham 1997). FLT-1 erkennt VEGF, PlGF und VEGF-B, und KDR erkennt VEGF und VEGF-C bis -E (Tab. 1).

Tab. 1: Mitglieder der VEGF Familie und ihre Rezeptoren

	FLT-1	KDR	FLT-4
VEGF (-A)	+	+	-
PlGF	+	-	-
VEGF-B	+	-	-
VEGF-C	-	+	+
VEGF-D	-	+	+
VEGF-E	-	+	-

Neben diesen kompletten Rezeptoren existiert auch noch eine lösliche Form von FLT-1, die ausschließlich aus den extrazellulären Domänen 1- 6 des Rezeptors besteht (Shibuya 1990). Die physiologische Rolle des löslichen Rezeptors sFLT-1 ist noch nicht geklärt (Hornig 1999). Von den anderen Rezeptoren sind bisher keine natürlich vorkommenden löslichen Rezeptoren bekannt. Mit Hilfe gentechnischer Methoden können aber von allen Rezeptoren lösliche Proteine hergestellt werden.

Die biologische Bedeutung von FLT-1 und KDR ist unterschiedlich (Waltenberger 1994). Die Bindung des Wachstumsfaktors löst bei beiden Rezeptoren eine andere Signalkaskade und Antwort aus. Befehle zur Differenzierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen laufen über KDR. Die Information zur Endothelzellmorphogenese erfolgt über FLT-1 (Shibuya 1999).

Auch die Affinität, mit der beide Rezeptoren VEGF binden, ist unterschiedlich. Waltenberger und Olander haben K_D -Werte von 9 - 10 pM für FLT-1 und 770 - 1000 pM für KDR auf Zellen ermittelt (Waltenberger 1994, Olander 1991). Bei Arbeiten mit transfizierten Zelllinien wurden K_D -Werte von 10 - 114 pM für FLT-1 und 77 - 600 pM für KDR gefunden (Seetharam 1995, Sawano 1996, Terman 1992, Quinn 1993). Neben den hochaffinen VEGF-Rezeptoren FLT-1 und KDR befinden sich auf der Zelloberfläche auch Rezeptoren mit geringer Affinität und eine Reihe Substanzen, die die Bindung von VEGF beeinflussen können. So wurde erst vor kurzem gezeigt, daß Neuropilin-1 (NP-1) ein Rezeptor für VEGF₁₆₅ und PlGF-2 ist (Soker 1998, Migdal 1998).

Daß Heparin und Heparansulfate die Rezeptor-Ligand-Bindung beeinflussen, ist schon länger bekannt (Gita-Goren 1992, Yayon 1991). Die Anwesenheit von Heparin erhöht die Affinität von FLT-1 bzw. KDR zu VEGF mit Ausnahme von VEGF₁₂₁. Dabei zeigt die VEGF-KDR-Bindung eine wesentliche stärkere Heparinabhängigkeit als die VEGF-FLT-1-Bindung (Tessler 1994, Terman 1994, Roeckl 1998).

2 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind multifunktionelle Glykoproteine von Vertebraten. Sie werden vom Immunsystem als Antwort auf körperfremde immunogene Moleküle (Antigene) oder körpereigene entartete Strukturen gebildet (Tijssen 1985). Verantwortlich für die Antikörperbildung im Körper sind die B-Lymphocyten. Aufgabe der Immunglobuline ist es, körperfremde Substanzen zu erkennen und durch Komplexierung und Aktivierung einer Reihe weiterer biologischer Prozesse, z.B. der

Das Fc-Fragment enthält die konstanten Regionen der schweren Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die Fab-Fragmente setzen sich aus je einer leichten Kette und dem restlichen Teil einer schweren Kette zusammen. Am N-Terminus der beiden Ketten befindet sich eine variable Region (V), über die das Antigen erkannt und gebunden wird. Der erkannte Bereich wird antigene Determinante oder Epitop genannt und umfaßt bei einem Protein meist nur drei bis acht Aminosäuren. Die Fab-Fragmente haben neben der variablen auch noch eine konstante Region (C).

Für die Etablierung immunologischer Nachweisverfahren wird die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, ihr Antigen zu erkennen und zu binden. Für den Aufbau von Assays werden spezifische Antikörper benötigt. Sie können *in vivo* durch die Immunisierung eines Wirbeltieres mit dem gewünschten Antigen (polyklonale Antikörper) oder *in vitro* in Zellkulturen (monoklonale Antikörper) hergestellt werden.

Die Immunisierung führt zu einem heterogenen Antikörpermisch im Serum, das keine einheitliche Affinität zum Antigen besitzt. Dieses Gemisch kann direkt verwendet werden. Meistens wird jedoch eine Reinigung mit Protein A oder G durchgeführt, wobei die Immunglobuline der Klasse G gewonnen werden (Tijssen 1985, Deshpande 1996). Im Anschluß kann noch eine Affinitätsreinigung mit dem Liganden durchgeführt, um die Spezifität zu erhöhen. Das Problem bei der Verwendung polyklonaler Antikörper ist, daß die einzelnen Chargen hinsichtlich Affinität und Spezifität variieren können. Ihr Vorteil ist allerdings, daß sie einfacher, günstiger und schneller hergestellt werden können.

Die Produktion guter monoklonaler Antikörper ist wesentlich aufwendiger und teurer. Durch die Fusion Antikörper-produzierender B-Zellen aus der Milz mit Tumorzellen werden Hybridomazellen (Stryer 1990, Köhler 1975) hergestellt, die für die Produktion der monoklonalen Antikörper in Zellkulturen genutzt werden. Für die Fusion wird eine einzelne Antikörper-produzierende Zelle selektioniert, so daß monoklonale Antikörper aus einer Population identischer Zellen hergestellt werden und daher homogen bzw. identisch sind (Tijssen 1985, Campell 1991).

3 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Eine Reihe intermolekularer Kräfte verursachen Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper, Rezeptor und Ligand und zwischen anderen Proteinen. Wasserstoffbrückenbindungen sowie Coulomb-, van der Waals- und hydrophobe Kräfte führen zu nicht kovalenten Bindungen zwischen den Aminosäuren der einzelnen Bindungspartner. Einzeln betrachtet sind diese Bindungen im Vergleich zu kovalenten Bindungen relativ schwach, aber aufgrund ihrer Vielzahl und ihres Zusammenspiels ermöglichen sie die reversible Bildung stabiler Rezeptor-Ligand bzw. Antigen-Antikörper-Komplexe (Tijssen 1985, Deshpande 1996). Die hydrophoben Kräfte leisten den größten Beitrag zur Komplexbildung. Beeinflusst wird die Bildung und Stabilität der Komplexe durch Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und die Anwesenheit organischer Lösungsmittel.

Die Selektivität, mit der die Komplexe gebildet werden, hat dazu geführt, daß Antigen-Antikörper-Reaktionen heute für analytische und therapeutische Zwecke genutzt werden. Als Beispiele seien hier nur Antikörper gegen Pestizide, mit denen verschiedene Pestizide in Trinkwasser bestimmt werden können, der Einsatz von Antikörpern in der medizinischen Diagnostik, z.B. für die Bestimmung von Blutgruppen, und neutralisierende Antikörper genannt (Hock 1989, Baron 1994, Wang 1995, Schmidt 1991). Neutralisierende Antikörper ermöglichen es, bestimmte Signalwege zu blockieren, da sie an derselben oder einer nahe gelegenen Stelle wie der natürliche Bindungspartner binden (Schlaeppli 1999, Borgstrom 1996).

Für den Einsatz von Antikörpern oder Rezeptoren in der Analytik ist die Affinität und die Spezifität, mit der sie ihren Liganden binden, von großer Bedeutung. Die Affinität beschreibt die Bindungsstärke zwischen den Reaktionspartnern und somit die Komplexstabilität. Die Spezifität beschreibt die Selektivität, mit der ein Ligand gebunden wird. Ein Bindungspartner ist um so spezifischer, je weniger unterschiedliche Proteine er aus einem heterogenen Gemisch bindet (Rehm 1996, Deshpande 1996). Rezeptoren sind spezifische Bindungsproteine, die nur die Mitglieder einer Proteinfamilie erkennen. Die

Spezifität von Antikörpern wird durch die Epitope, die sie erkennen, geprägt. Daher gibt es hochspezifische Antikörper, die nur ein Protein erkennen, aber auch Antikörper die ein breites Spektrum von Analyten binden.

4 Ligand-Bindungsassays

4.1 Allgemeines

Unter Ligand-Bindungsassays versteht man bioanalytische Nachweismethoden, die auf der Fähigkeit eines Bindungsmoleküls basieren, einen Analyten spezifisch zu erkennen und nicht kovalent zu binden (Weller 1992). So lassen sich z.B. die folgenden biologischen Bindungssysteme hervorragend für analytische Zwecke nutzen.

Antikörper	-	Antigen
Rezeptor	-	Ligand
DNA/RNA	-	komplementäre Einzelstränge

Mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Rezeptor lassen sich unterschiedliche Proteine, Wachstumsfaktoren, Pestizide, Antibiotika, Anabolika und andere Substanzen über eine Affinitätsreaktion nachweisen. In den letzten Jahren haben sich eine ganze Reihe unterschiedlicher Nachweisverfahren in der medizinischen Diagnostik und der Umweltanalytik auf der Basis natürlicher Bindungsproteine etabliert (Hock 1989, Baron 1994, Soldin 1996). Ihr Vorteil gegenüber klassischen Analysemethoden besteht darin, daß sie sehr spezifisch einen Analyten bzw. Analytanaloge erkennen. Mit Hilfe von Rezeptorassays lassen sich biologische Konsequenzen abschätzen, die sich aus der Anwesenheit einiger Chemikalien in der Umwelt bzw. in Organismen ergeben. Wird beispielsweise eine chemische Substanz, die einem natürlich vorkommenden Hormon ähnelt, im Rezeptorassay erkannt, so ist davon auszugehen, daß sie in Organismen eine Ver-

änderung hervorruft. Die Spezifität dieser Methoden hat aber auch Nachteile. Es werden nur die Rezeptor-spezifischen Analyte und nicht alle Inhaltsstoffe einer Probe erfaßt. Mit Hilfe klassischer Methoden wie NMR, Massenspektroskopie, HPLC oder Gaschromatographie können alle Inhaltsstoffe einer Probe erfaßt werden. Allerdings können mit diesen Methoden Viren, Bakterien oder Mikroorganismen nur sehr unzureichend bestimmt werden. Hinzu kommt, daß die biologische Aktivität von Substanzen, wie Schadstoffen oder Hormonanaloga, nicht erfaßt wird. Je nach analytischer Problemstellung können die klassischen oder die biochemischen Methoden oder eine Kombination aus beiden von Vorteil sein. In der Medizin sind immunologische Nachweisverfahren für verschiedene Hormone, Antikörper, Pharmazeutika und deren Metabolite zu Standardanalysemethoden geworden (Gosling 1990, Keller 1991). Bei der Herstellung rekombinanter Pharmaproteine, die später für medizinische Zwecke oder zum Screenen verwendet werden sollen, ist es wichtig, nicht nur ihre Konzentration und Reinheit nach Produktion und Aufreinigung zu kontrollieren, sondern auch, ob sie in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen. Nur dann können sie therapeutisch wirksam werden oder im Screening zu guten Ergebnissen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Relidas (**Rezeptor-Ligand-Interaktion-Detektionsassay**) zum Nachweis von biologisch aktivem VEGF auf Basis seiner löslichen Rezeptorproteine entwickelt.

4.2 Assayformate

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, bioanalytische Assays für den Nachweis bestimmter Substanzen und Proteine aufzubauen. Die Wahl des Testformates richtet sich nach den vorhandenen Meßgeräten und Bindungsproteinen sowie den Ergebnissen, die mit dem Assay gewonnen werden sollen. So wird man z.B. für ein High Throughput Screening einen anderen Assay entwickeln als für die kinetische Untersuchung einer Rezeptor-Ligand-Interaktion.

Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten sowie kompetitiven und nicht-kompetitiven Assayformaten. Ohne den Einsatz besonderer Techniken ist die Reaktion zwischen zwei Bindungspartnern, z.B. Antigen und Antikörper, nicht direkt analytisch meßbar. Es ist dann notwendig, einen der Bindungspartner so zu modifizieren, daß er nachgewiesen werden kann. Üblich sind Kopplungen mit Radioisotopen, Fluorogenen und Enzymen (Schwalbe-Fehl 1986, Tijssen 1985). Werden markierte Bindungspartner oder sekundäre markierte Proteine, die an einen der Komplexpartner binden, für die Detektion verwendet, so spricht man von indirekten Assayformaten.

Bei direkten Assayformaten werden die physikochemischen Eigenschaften (Masse, Ladung, relative Dielektrizitätskonstante) der Bindungspartner genutzt, um die Komplexbildung direkt zu beobachten. Dazu wird ein Bindungspartner auf der Oberfläche eines geeigneten Sensors immobilisiert. Durch Zugabe des anderen Bindungspartners kommt es zur Komplexbildung, die ein optisches oder elektrisches Signal erzeugen kann (Polzius 1995). Bei Meßsystemen mit zeitlicher Auflösung kann die Bindung in Echt-Zeit beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für den Nachweis von biologisch aktivem VEGF ein einfacher Rezeptorassay entwickelt werden, der schnell und leicht durchzuführen ist und kein radioaktives Material benötigt. Daher wurden in Anlehnung an die bereits etablierten ELISA-Formate in Medizin und Umweltanalytik indirekte Mikrotiterplattenassays auf Basis der löslichen Rezeptoren entwickelt (Kap. II.4.2.1). Ebenfalls untersucht wurde, inwieweit sich direkte optische Affinitätssensoren, wie das BIAcore-System, für den Nachweis von biologisch aktivem VEGF und die Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen VEGF und seinen löslichen Rezeptorproteinen sFLT-1 und sKDR nutzen lassen (Kap. II.4.2.2).

4.2.1 Indirekte Assayformate auf der Mikrotiterplatte

Indirekte Assays können in einem kompetitiven oder nicht-kompetitiven Format aufgebaut werden. Beide Möglichkeiten werden im Rahmen dieser Arbeit für den Nachweis von VEGF genutzt. In beiden Fällen werden die löslichen Rezeptoren sFLT-1 oder sKDR als Fängerproteine adsorptiv auf den Mikrotiterplatten immobilisiert. Bei dem kompetitiven Relida (Abb. 4) liegt der immobilisierte Rezeptor (R) im Unterschuß vor und der nachzuweisende Ligand VEGF (L) konkurriert mit einem markierten Liganden (L*) um die begrenzte Anzahl Bindungsstellen:

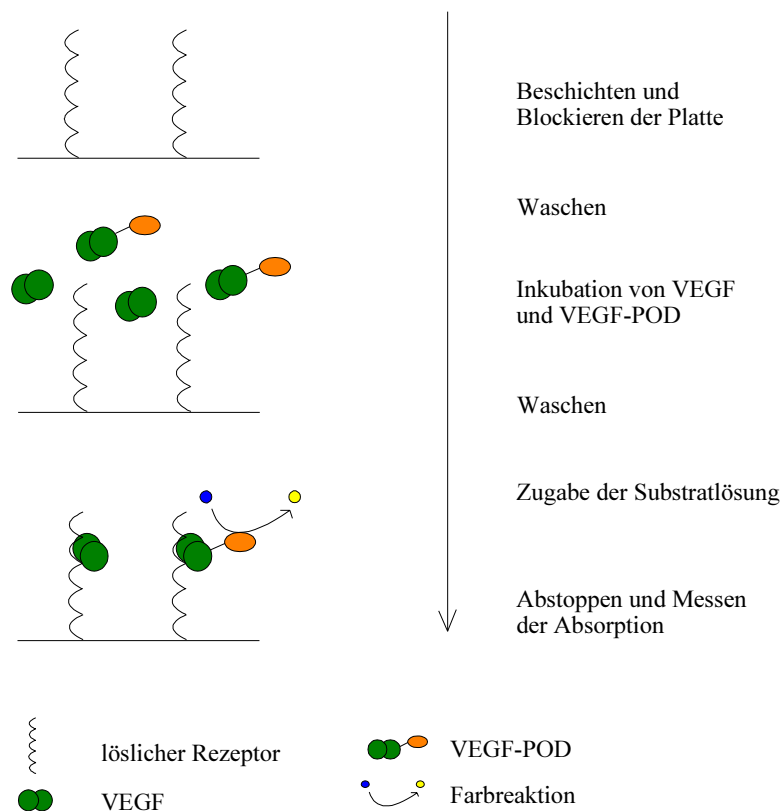


Abb. 4: Schematische Darstellung eines kompetitiven Rezeptorassays. VEGF und VEGD-POD konkurrieren um die begrenzten Rezeptorbindungsplätze auf der Oberfläche.

Bei dem markierten Liganden, auch Tracer genannt, handelt es sich um selbsthergestellte VEGF-Peroxidase (POD)- oder ^{125}J -VEGF-Konjugate (Kap III 2.2.2). Erst über die Konkurrenzreaktion mit dem Tracer wird die Bindung von VEGF an den Rezeptor sichtbar. Je mehr Wachstumsfaktor sich in der Probe befindet, desto stärker verschiebt sich das Gleichgewicht (Gl. 1) nach links zu Gunsten des VEGF-Rezeptor-Komplexes und der markierte Ligand wird verdrängt. Da die Menge an gebundenen markierten Liganden bestimmt wird, ist das erhaltene Signal umgekehrt proportional zur gebundenen VEGF-Menge (Abb. 5). Die Menge des gebundenen ^{125}J -VEGF wurde mit einem γ -Counter detektiert. Die Peroxidasekonzentration auf der Plattenoberfläche wurde mit den Enzymsubstraten Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin nachgewiesen. Das enzymatisch gebildete Chromogen wurde mit einem ELISA-Reader über die Differenz der Extinktion der Wellenlängen 450 nm und 650 nm bestimmt.

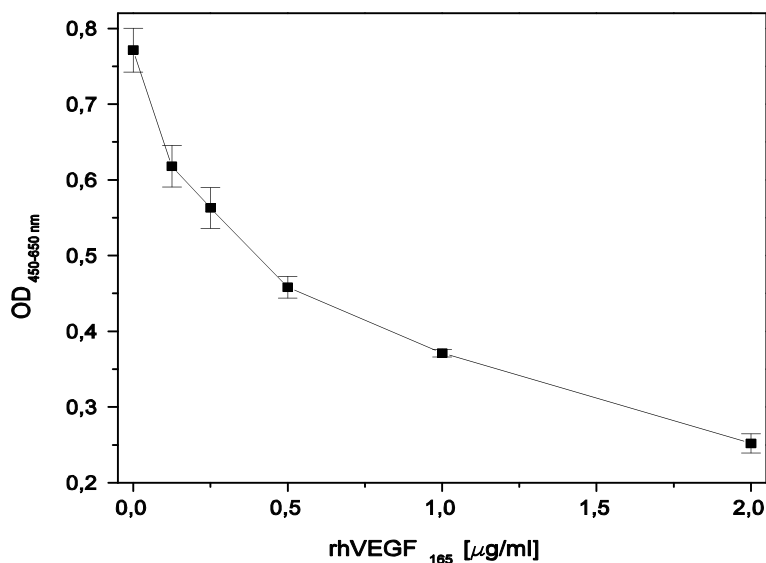


Abb. 5: Auf einer mit sFLT-1 und Heparin beschichteten Platte konkurrieren VEGF und das VEGF-POD-Konjugat um die vorhandenen Bindungsplätze. Bei steigender VEGF-Konzentration wird das Konjugat zunehmend verdrängt und die Signalhöhe nimmt ab.

Bei den nicht-kompetitiven Assays gibt es zwei verschiedene Prinzipien: Entweder wird der Analyt direkt auf der Oberfläche immobilisiert und mit einem geeigneten Bindungspartner nachgewiesen (Abb. 6 A) oder er wird mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Bindungspartnern in einem Sandwichformat (Abb. 6 B) detektiert.

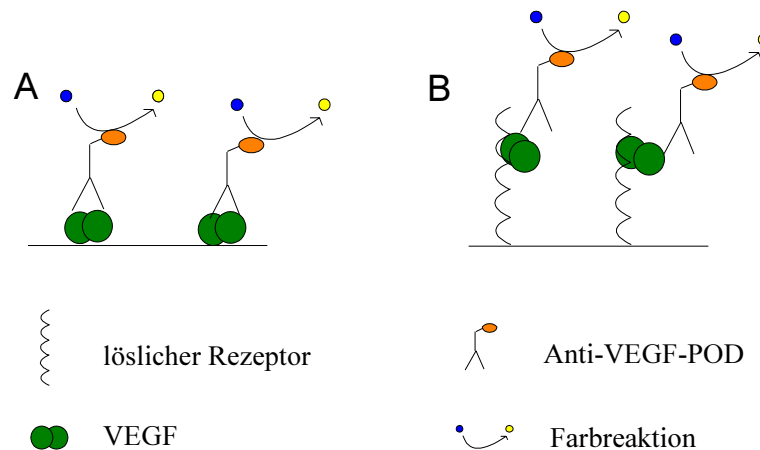


Abb. 6: Schematische Darstellung nicht-kompetitiver Assayformate. Entweder wird der Analyt direkt immobilisiert (A) und mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen oder es wird ein Bindungspartner immobilisiert (B) und der Analyt mit Hilfe eines weiteren Bindungspartner nachgewiesen (Sandwichformat).

Die erste Möglichkeit hat den Vorteil, daß nur ein Bindungspartner benötigt wird und die Versuchsdauer sehr kurz ist. Allerdings ist diese Methode für die Untersuchung von Realproben ungeeignet. Realproben enthalten neben dem Analyten große Mengen anderer Proteine. Durch die Adsorption des Proteingemisches würde sich nur eine sehr geringe Analytkonzentration auf der Oberfläche befinden, die nicht für einen Nachweis ausreicht. Die Western Blot Analyse und die SPOT-Methode können zu dieser Assaygruppe gerechnet werden. Bei der Western Blot Analyse wird der Wachstumsfaktor nach einer Gelelektrophorese auf eine Membran geblottet (Kap. III.2.4). Bei der SPOT-Synthese werden definierten Teilsequenzen eines Proteins von je 15 Aminosäuren auf eine Membran immobilisiert (Frank 1992).

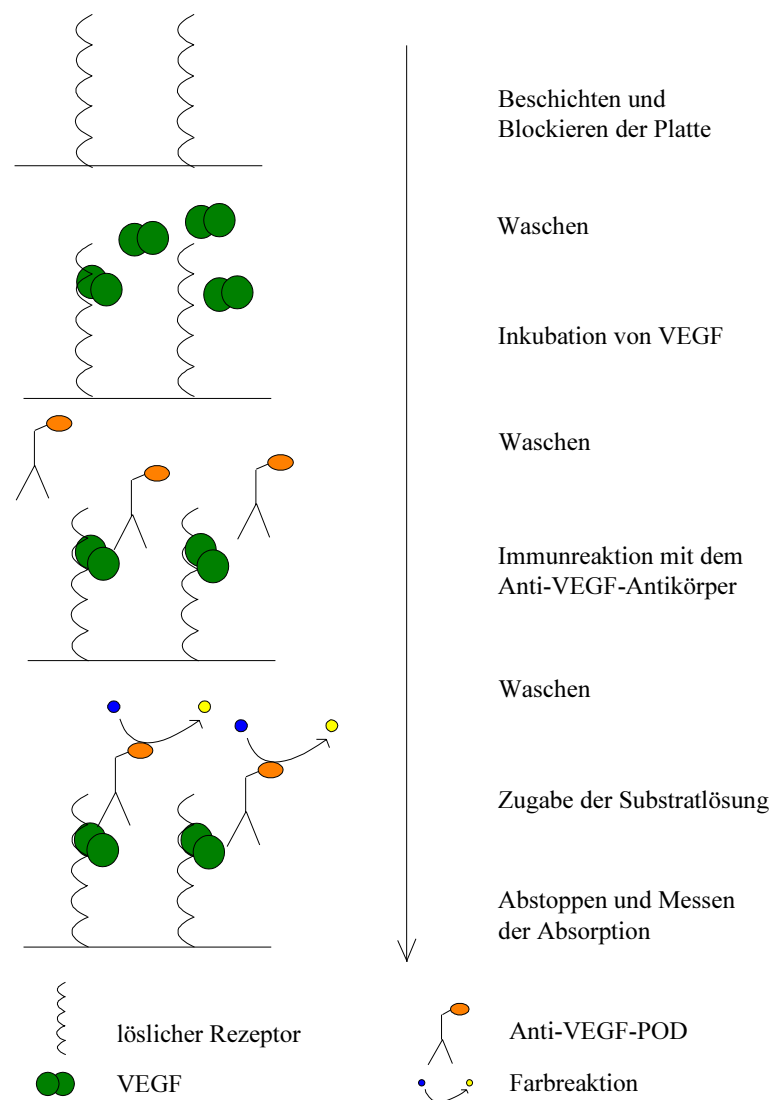


Abb. 7: Schematische Darstellung eines Rezeptorassays im Sandwichformat. Die Detektion des gebundenen Liganden VEGF kann über einen mit Peroxidase markierten Anti-VEGF-Antikörper oder eine Kombination aus Anti-VEGF- und Peroxidase-markierten-Anti-Anti-VEGF-Antikörper erfolgen.

Assays im Sandwichformat eignen sich hervorragend für die Untersuchung von Realproben. Ein Sandwichassay setzt sich aus einem Bindungsprotein als Fänger auf der Oberfläche und einem zweiten Bindungspartner für den Nachweis des gebundenen Analyten zusammen (Abb. 7). Die löslichen Rezeptorproteine sFLT-1 oder sKDR (R) werden als Fänger auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Zugabe des VEGF-Standards oder der Probe kommt es zur Komplexbildung (RL) zwischen den

löslichen Rezeptoren (R) und den VEGF-Molekülen (L) (Gl. 2). Durch einen Waschschritt werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Es erfolgt der Nachweis des gebundenen Wachstumsfaktors durch einen Peroxidase-markierten Antikörper (Ak*).



Im Gegensatz zum kompetitiven Assay ist die gemessene Absorption hier direkt proportional zur gebundenen Antikörpermenge und somit zur VEGF-Konzentration (Abb. 8).

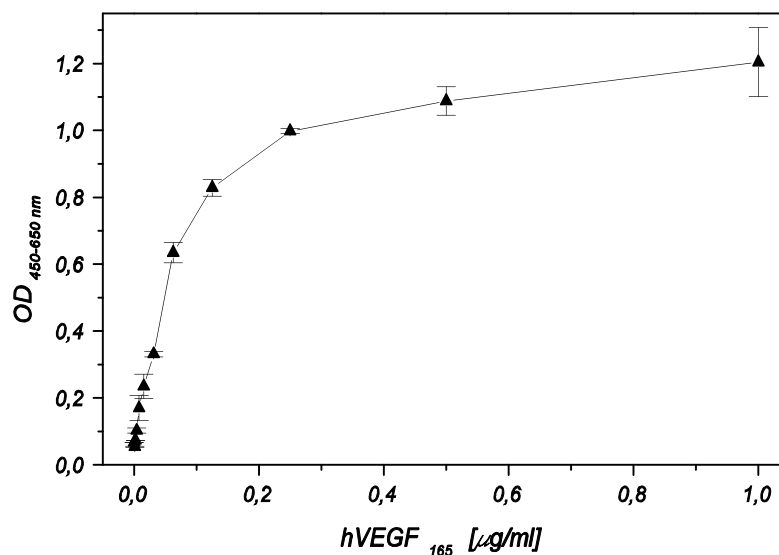


Abb. 8: Bindung von VEGF an sKDR in Gegenwart von Heparin. Die Detektion erfolgte über die Kombination Anti-VEGF-Antikörper und Anti-Maus-POD.

Beide Assayformate haben ihre Vorzüge. So ist der kompetitive Test in der Durchführung meist schneller und ermöglicht auch den Nachweis sehr kleiner Analyten. Allerdings muß für dieses Format ein geeignetes Konjugat zur Verfügung stehen, und nicht immer ist es möglich, einen passenden Tracer zu kaufen oder selbst herzustellen. Assays im Sandwichformat zeichnen sich durch eine größere Empfindlichkeit und

Selektivität aus. Aber der Analyt muß ausreichend groß sein und unterschiedliche Epitope für zwei Bindungspartner besitzen. Bei sehr kleinen Molekülen ist das nicht möglich. Oft ist es schwierig, eine geeignete Bindungspartnerkombination zu finden.

4.2.2 BIAcore - ein direkter Affinitätssensor

Direkte Nachweismethoden nutzen die physikochemischen Merkmale der Bindungspartner, um sie bzw. ihre Bindung nachzuweisen. Tracer oder markierte Antikörper, wie sie für indirekte Methoden benötigt werden, sind überflüssig. Bei direkten Affinitätssensoren wird einer der Reaktionspartner direkt auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Kommt es zur Bindung eines Liganden, so wird die durch die Ligandbindung verursachte Veränderung auf der Oberfläche erfaßt und ausgewertet. Bei dem BIAcore-System (BIAcore AB, Schweden) handelt es sich um einen optischen Affinitätssensor, bei dem die Signaländerung in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet wird. Die Wechselwirkungen können direkt in Echtzeit beobachtet werden. Die zeitabhängige Erfassung der Signalhöhe ermöglicht neben der Bestimmung der Konzentration des Analyten auch die Berechnung der kinetischen Daten der Bindung (Myszka 1997, Karlsson 1993, Yu 1998, Björquist 1997, Schuck 1998).

4.2.2.1 Grundlagen des Meßprinzips

Das BIAcore-System (Löfås 1990, Schindler 1992) setzt sich zusammen aus einem miniaturisierten Fließinjektionssystem, das ein Arbeiten mit sehr kleinen Mengen erlaubt, und einem integrierten optischen Sensor (Abb. 9), der auf dem Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) basiert.

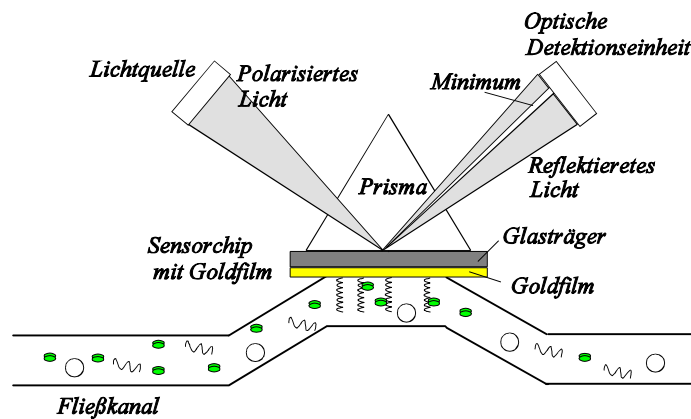


Abb. 9: Schematische Darstellung einer Fließzelle und des SPR-Sensors. Auf der Rückseite des Sensorchips wird polarisiertes Licht eingestrahlt und reflektiert. Es kommt zur Anregung der Elektronen im Goldfilm und der Bildung eines evaneszenten Feldes, das bis in den Fließweg reicht.

SPR-Sensoren nutzen das quantenmechanische Phänomen der optischen Schwingungsanregung von Elektronen in dünnen Metallfilmen (Kretschmann 1968). Durch die Wechselwirkung mit Photonen entstehen Schwingungen, sog. Plasmonen, die sich in der Metallschicht wellenförmig ausbreiten (Lawrence 1992). Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger mit einem ca. 50 nm dünnen Goldfilm, an dessen Oberfläche eine Matrix aus carboxymethyliertem Dextran gekoppelt ist. Durch ein Prisma wird auf die Rückseite des Sensors polarisiertes Licht eingestrahlt und reflektiert (Abb. 9). Über eine CCD-Zeile (charge coupled device) wird das Winkelspektrum des reflektierten Lichts erfaßt. Verbunden mit der optischen Schwingungsanregung ist eine elektromagnetische Welle, die nicht an der Phasengrenze aufhört, sondern als evaneszentes, d.h. exponentiell abnehmendes Feld, in das benachbarte Medium hineinreicht. Das evaneszentes Feld reicht ca. 300 nm in die Fließzelle hinein. Auf der dem Fließweg zugewandten Sensorseite befindet sich eine flexible Dextranmatrix, an die die Proteine kovalent gekoppelt werden können. Kommt es zu Veränderungen entweder durch Wechsel zu einem Puffer anderer optischer Dichte oder durch Anlagerung eines Liganden (Abb. 10) an seinen

bereits immobilisierten Bindungspartner, so ändert sich der Brechungsindex und damit der Winkel, unter dem die Resonanz stattfindet. Bei der SPR-Anregung wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge und eines bestimmten Einstrahlwinkels absorbiert. Im reflektierten Licht kommt es zu einem Intensitätsminimum. Bereits geringe Änderungen im Bereich des evaneszenten Feldes führen zu Veränderungen im SPR-Effekt und somit zu einer Verschiebung des Intensitätsminimums (Abb. 10 B). Daher können Molekülwechselwirkungen, die im evaneszenten Feld stattfinden, sehr sensitiv detektiert werden.

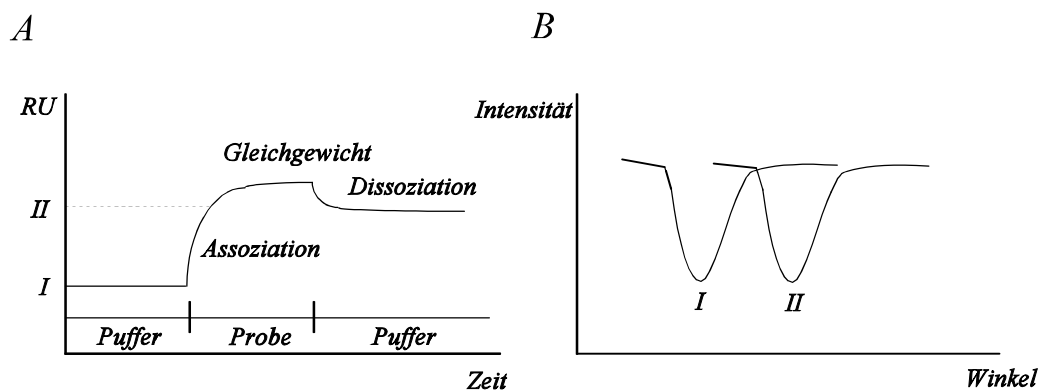


Abb. 10: Der schematische Kurvenverlauf (A) einer Messung zeigt, wie nach der Probenzugabe die Bindung des Liganden beginnt und das Signal steigt. In Abhängigkeit der vorhandenen Bindungsplätze, d.h. der immobilisierten Rezeptormenge, stellt sich ein Gleichgewicht ein, und nach Ende der Probenzugabe beginnt die Dissoziation des gebundenen Liganden. Änderungen in der Massenbeladung auf der Sensoroberfläche beeinflussen das evaneszente Feld und führen zur Veränderung der Lage des Intensitätsminimums im Reflexionswinkelspektrum (B).

Das Sensorsignal wird in Resonance-Units (RU) angegeben. Experimentelle Kalibrierungen mit radioaktiv markierten Proteinen haben gezeigt, daß eine Signalzunahme von 1000 RU einer Anlagerung von 1 ng/mm² Protein entspricht (Stenberg 1991). Veränderungen auf der Sensoroberfläche können am BIAcore direkt in Echtzeit beobachtet werden. Man erhält ein Diagramm, in dem die Signalthöhe über der Zeit dargestellt ist.

4.2.2.2 Messen mit dem BIAcore-System

Messungen am BIAcore setzen sich aus den folgenden Teilschritten zusammen:

1. Wahl der Sensoroberfläche und Immobilisierung eines Bindungspartners;
2. Spülen der Oberfläche mit dem Assaypuffer bis zum Erhalt einer stabilen Basislinie;
3. Zugabe der Probe und Beobachtung der Wechselwirkungen;
4. Regeneration der Oberfläche, d.h. Entfernen des gebundenen Liganden;
5. Wiederholen der Schritte 2 bis 4, um weitere Proben zu untersuchen;
6. Auswertung der Messung.

Die genauen Versuchsbedingungen werden in Kapitel III.2.8 beschrieben. In allen Experimenten wurden die löslichen Rezeptoren über ihre Aminofunktionen mit Hilfe von N-Ethyl-N-(dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) an die carboxylierte Dextranmatrix der CM5-Sensorchips gekoppelt (Abb. 11). Noch vorhandene aktive Stellen wurden mit Ethanolamin abgesättigt. Auf der Sensoroberfläche setzt sich das Mikrofließsystem aus vier hintereinander liegenden Fließzellen zusammen, die einzeln oder in Reihe angesteuert werden können. Dieser Aufbau ermöglicht die Kopplung verschiedener Proteine oder Proteinkonzentration auf einem Sensor. Die kleinen Fließwege und die Empfindlichkeit des Sensors erlauben ein Arbeiten mit geringen Probenvolumina von 5 bis 100 µl. Die erste der vier Zellen diente in allen Experimenten als Referenzzelle, um unspezifische Bindungen und Matrixeffekte zu erfassen. Dafür wurde die Sensoroberfläche in dieser Zelle aktiviert und direkt wieder deaktiviert oder ein für die Bindung irrelevantes Protein immobilisiert.

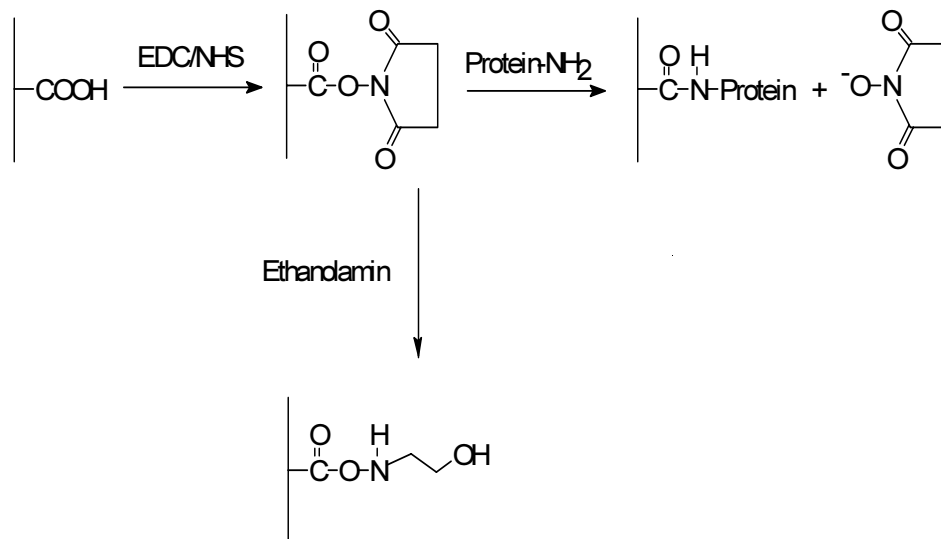


Abb. 11: Kopplung von Proteinen über EDC/NHS an die Sensoroberfläche. Noch aktive Kopplungsstellen werden mit Ethanolamin deaktiviert.

Die quantitative Analyse von Proben im BIAcore erfordert einen anderen Versuchsaufbau als die kinetische Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Kap. III.2.8). Für die Konzentrationsbestimmung ist es sinnvoll, große Mengen Rezeptor zu immobilisieren und eine geringe Fließrate zu wählen. Neben der längeren Verweilzeit ist mit der geringeren Fließrate auch eine niedrigere Diffusionsgeschwindigkeit verbunden. Je mehr Rezeptor sich auf der Oberfläche befindet und je langsamer die Probe darüber fließt, desto mehr Ligand pro Probe wird gebunden. Die injizierte Probenmenge und die damit verbundene Verweilzeit der Probe an der Oberfläche beeinflussen ebenfalls die Sensitivität des Assays. Bei kinetischen Untersuchungen ist es wichtig, möglichst geringe Rezeptormengen zu immobilisieren und mit einer nicht zu langsamen Fließrate zu arbeiten. Sonst treten vor allem bei Bindungspartnern hoher Affinität aufgrund der Diffusionsgeschwindigkeit Massentransportlimitierungen auf. Die Bindungsreaktion ist dann diffusions- und nicht mehr reaktionskontrolliert, wodurch die Auswertung erschwert wird.

4.2.3 Fließinjektionsanalyse (FIA)

4.2.3.1 Grundlagen

Der Begriff der Fließinjektionsanalyse wurde Anfang der 70er Jahren von Ruzicka und Hansen geprägt (Ruzicka 1975). Es handelt sich dabei um ein automatisiertes Verfahren zur Durchführung naßchemischer Analysen. Diese Technik basiert auf der direkten Injektion eines bestimmten Probenvolumens in einen unsegmentierten, kontinuierlich fließenden Trägerstrom, der als Carrier bezeichnet wird. Der Carrier transportiert die injizierte Probe als Segment zu einem kontinuierlich arbeitenden Detektor. Damit können physikalische (z.B. Färbung, Leitfähigkeit) oder chemische Parameter der Probe bestimmt werden, wobei der eigentlichen Detektion physikalische (z.B. Diffusion, Dialyse) oder (bio)chemische Reaktionen vorgeschaltet werden (Ruzicka 1981). Die Reaktionen befinden sich nur selten im Gleichgewicht, so daß es besonders wichtig ist, Zeitabläufe exakt einzuhalten, um die verschiedenen Messungen miteinander vergleichen zu können. In der GBF wird das Computerprogramm FIAFOX zur voll-automatischen Steuerung von FIA-Systemen verwendet (Stiene 1995).

Die große Flexibilität des Systems ermöglicht eine einfache Adaptation an verschiedene analytische Fragestellungen (Ruzicka 1981, Olsen 1982, Valcarcel 1987, Fang 1993). Verschiedene Komponenten, wie Pumpen, Ventile, Mischkammern, Diffusionskammern, Dialyseeinheiten, Säulenreaktoren mit immobilisierten Bindungspartnern und verschiedene Detektorsysteme können miteinander kombiniert werden (Rohm 1996). Gegenüber chromatographischen Methoden hat die Fließinjektionsanalyse den Vorteil, daß sie mit biochemischen Komponenten kombiniert werden kann und so eine einfache und spezifische Analyterkennung möglich ist. Da der Analyt direkt identifiziert wird, ist eine Zuordnung über Retentionszeiten und weitere analytische Methoden nicht mehr notwendig. Werden die Bindungspartner direkt auf der Oberfläche des Detektors immobilisiert, findet die biologische Erkennung und die damit verbundene physikalische oder chemische Veränderung auf der Detektorfläche nahezu gleichzeitig statt. Oft

werden die biologischen Bindungspartner jedoch auf Trägermaterialien, wie Glas-Beads, CPG (controlled pore glass), Ionentauschern oder Polymeren fixiert, die in einem Säulenreaktor vor dem Detektor im Pufferstrom plziert werden. So findet die Erkennung des Analyten bzw. die biochemische Reaktion räumlich und zeitlich getrennt von der eigentlichen Detektion statt. Der Einsatz von Reaktoren führt aufgrund der größeren Oberfläche dazu, daß eine größere Menge der biologischen Bindungspartner immobilisiert werden kann. Dadurch steigt die Sensitivität, und die Aktivitätsverluste, die im Laufe mehrerer Meßzyklen auftreten können, sind geringer.

Im Bereich der Prozeßüberwachung haben sich FIA-Systeme vor allem zur Bestimmung von Medienbestandteilen, wie Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat, Alkohol etabliert, die auf der Analytumsetzung durch Enzyme beruhen (Rohm 1996, Genrich 1996, Mohns 1996). Ähnliche Systeme finden sich auch im Bereich der Lebensmittel- und medizinischen Analytik. Es wurden aber auch bereits automatisierte Systeme zur Proteinbestimmung über Antikörper beschrieben (Freitag 1996, Polzius 1995, Stiene 1997), so daß im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, inwieweit es möglich ist, ein solches System für den Nachweis von VEGF aufzubauen.

4.2.3.2 Aufbau des verwendeten FIA-Systems

Der Aufbau des in Abbildung 12 dargestellten Systems wurde von M. Stiene übernommen (Stiene 1997) und für die Entwicklung eines Nachweisverfahren von VEGF mit Hilfe der FIA-Technologie genutzt. Dieses FIA-System besteht aus zwei Fließwegen, die über verschiedene Ventile ineinander geschaltet werden können. Über den Bypass wird entweder Wasser oder die Enzymsubstrate, eine Kombination aus einer p-Hydrochinon- und einer Wasserstoffperoxidlösung, zum Detektor geleitet. Gleichzeitig wird im Affinitätsreaktor der Nachweis des Wachstumsfaktors aufgebaut (Kap. II.4.2.3.3). Die benötigten Lösungen werden nacheinander durch Umschalten des Latekventile injiziert (Abb. 12).

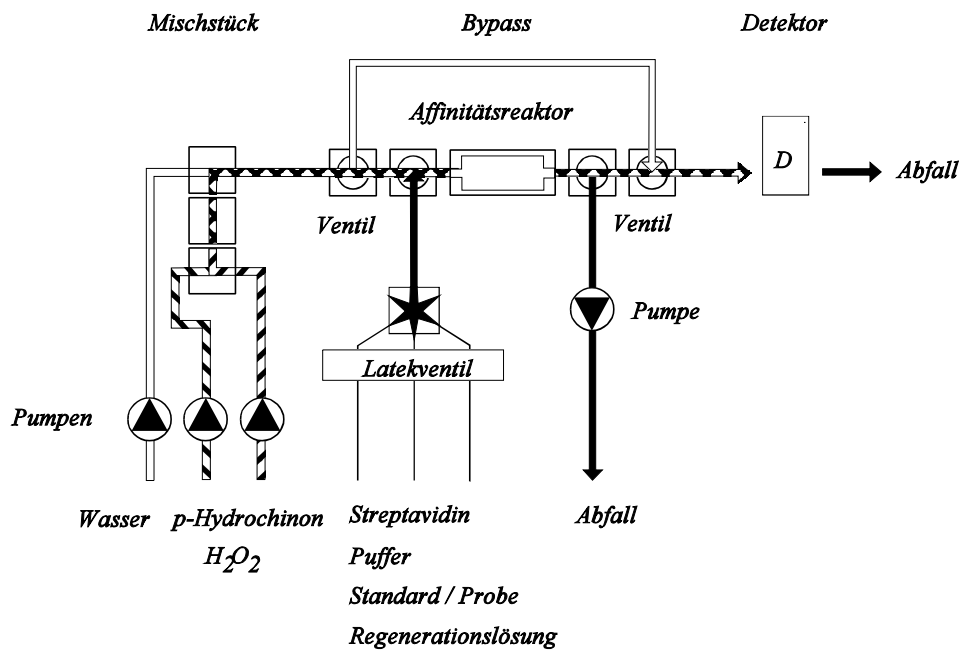
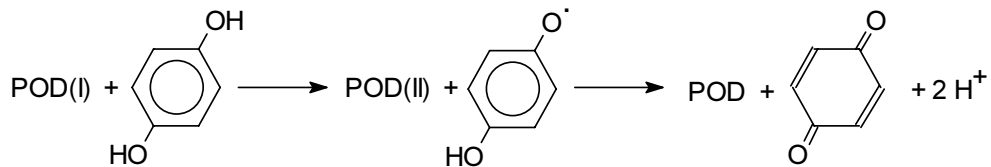
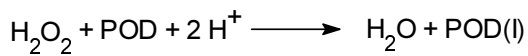


Abb. 12: Schematische Darstellung der verwendeten FIA (modifiziert nach Stiene 1997).

Die Injektion der Probe bzw. des Reaktionsgemisches erfolgt über das Latekventil und einen Autosampler. Der Nachweis des Wachstumsfaktors erfolgt über eine Konkurrenzreaktion. VEGF aus der Probe bzw. aus dem Standard konkurrieren mit einem VEGF-Biotin-Konjugat um die vorhandenen Antikörperbindungsstellen. Bei dem eingesetzten Antikörper handelt es sich um ein Anti-VEGF-POD-Konjugat. Auf den Ablauf der Affinitätsreaktionen und der Messung wird im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen. Sie führen letzten Endes dazu, daß eine von der VEGF-Konzentration abhängige Peroxidase-Menge im Affinitätsreaktor gebunden ist, so daß die eigentliche Detektion durch den Nachweis der enzymatisch umgesetzten Peroxidasesubstrate erfolgt. Dazu werden die Ventile zwischen den beiden Fließwegen umgeschaltet und das Enzymsubstrat für einige Minuten über den Reaktor zum Detektor geleitet. Von der Peroxidase werden Hydrochinon und Wasserstoffperoxid zu p-Benzochinon und Wasser umgesetzt (Abb. 13).

Enzymreaktionen:



Elektrodenreaktion:

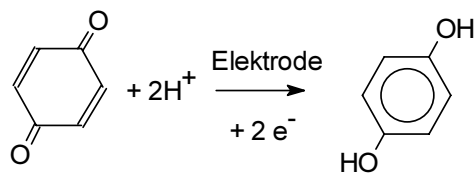
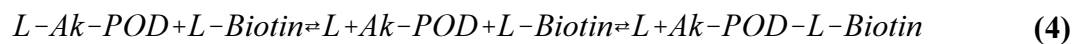


Abb. 13: Die Enzymreaktion setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Bei der Zersetzung von H_2O_2 geht die Peroxidase in einen oxidierten Zustand über (POD(I)). Mit p-Hydrochinon reagiert die oxidierte Form über einen Zwischenschritt zu p-Benzochinon und der aktiven Ausgangsform der Peroxidase. Das Enzym wird von der einfach oxidierten Form über eine weitere Oxidationsstufe und der anschließenden Aufnahme von zwei Elektronen reaktiviert. An der Elektrode wird das enzymatisch gebildete p-Benzochinon zu p-Hydrochinon reduziert (Stiene 1997).

Für die amperometrische Detektion wurde eine Durchflußzelle mit einer Drei-Elektrodenkonfiguration verwendet, die mit einer Glassy Carbon Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode bestückt war. An der Elektrode wird das bei der enzymatischen Reaktion entstandene p-Benzochinon bei einem Potential von -150 mV vs Ag/AgCl zu Hydrochinon reduziert (Abb. 13). Der resultierende Strom ist ein Maß für die an der Oberfläche umgesetzten Moleküle pro Zeiteinheit und proportional zur gebundenen Peroxidasemenge im Reaktor.

4.2.3.3 Messen mit dem FIA-System

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen dem Wachstumsfaktor (L) in der Probe bzw. in der Standardlösung und einer definierten Menge des VEGF-Biotin-Konjugates (L-Biotin) um die Bindungsstellen an einem Peroxidase markierten Anti-VEGF-Antikörper (Ak-POD).



Je höher die VEGF-Konzentration ist, desto weniger VEGF-Biotin kann an dem Antikörper binden. Die Reaktion wurde außerhalb des FIA-Systems durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten in einem Eppendorfgemisch und inkubiert (Kap. III.2.9.2). Die Trennung der verschiedenen Immunkomplexe fand anschließend im FIA-System statt. Dazu wurde der Assay wie in Abbildung 14 dargestellt und in Kapitel III.2.9.2 beschrieben durchgeführt. Zunächst wird eine Streptavidinlösung über die biotinylierte Reaktoroberfläche geleitet. Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin (Bayer 1980) und wurde deshalb rasch und effektiv im Reaktor immobilisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch injiziert. Über die Streptavidinmoleküle erfolgte die Bindung der biotinylierten Wachstumsfaktoren und der gebildeten Komplexe aus VEGF-Biotin und Anti-VEGF-POD. Im nächsten Waschschrift wurden der unmarkierte Wachstumsfaktor und seine Komplexe mit dem Antikörper-POD-Konjugat aus dem Reaktor entfernt. Nach Zugabe der Enzymsubstrate erfolgte deren Umsetzung im Reaktor und der Transport (Kap. II.4.2.3.2).

Das Signal war proportional zur gebundenen POD-Menge im Reaktor. Diese wiederum war ein Maß für die Menge an VEGF in der Probe bzw. dem Standard. Je mehr VEGF mit dem VEGF-Biotin-Konjugat um die Bindungsstellen des Peroxidase markierten Antikörpers konkurriert (Gl. 4), desto weniger Komplexe aus VEGF-Biotin und Anti-VEGF-POD entstanden und desto geringer war die POD-Menge im Reaktor. Nach der Detektion wurde die Oberfläche des Reaktors durch Säurezugabe regeneriert und es konnte mit einem neuen Meßzyklus begonnen werden.

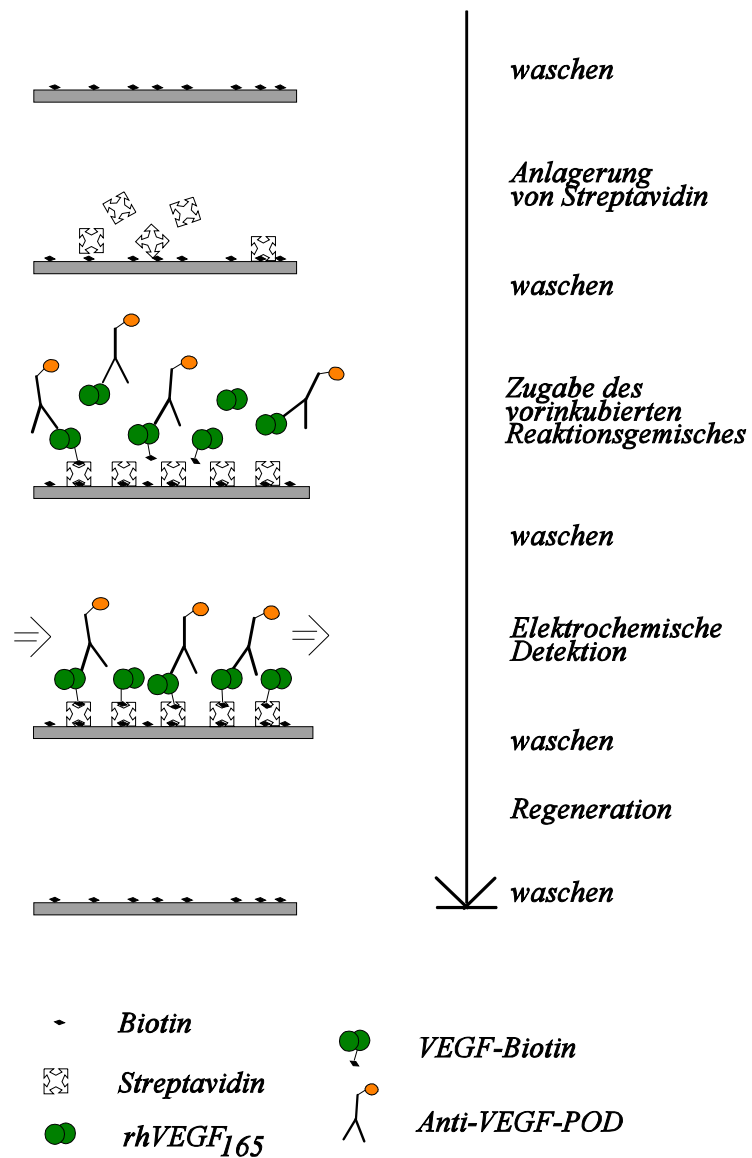


Abb. 14: Schematische Darstellung der Detektion von rhVEGF₁₆₅ mit Hilfe des FIA-Systems.

4.2.3.4 Herstellung der Konjugate und des biotinylierten Reaktors

4.2.3.4.1 Biotinylierung von Proteinen

Mit Hilfe von Substanzen wie Sulfo-succinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat (Sulfo-NHS-LC-Biotin) lassen sich Biotinreste an Proteine koppeln (Kap. III.2.2.3). Die Verbindung setzt sich aus einem Biotinrest, einem Spacer und einem N-Hydroxysulfo-succinimid (Sulfo-NHS)-Ester als reaktive Gruppe zusammen. Das Biotinderivat reagiert mit den primären Aminogruppen von Proteinen unter Abspaltung von Sulfo-NHS zu einem Amid (Abb. 15). Der Spacer zwischen dem Biotinrest und dem Wachstumsfaktor ist notwendig, damit keine sterischen Hinderungen bei der Bindung des Konjugates an Streptavidin und der anschließenden Erkennung des Proteins durch einen Antikörper auftreten.

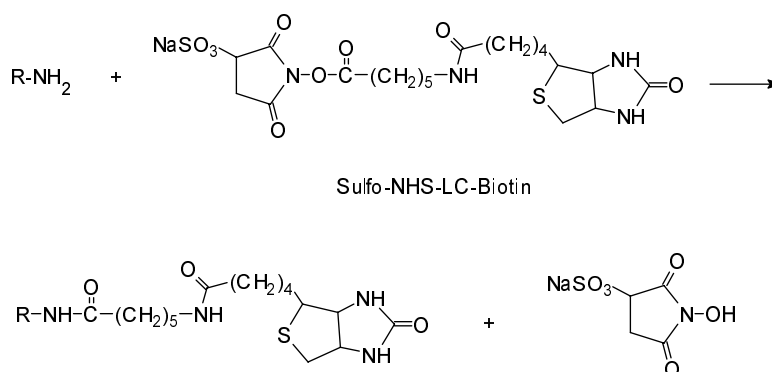


Abb. 15: Proteine können mit Hilfe von Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert werden. Die Kopplungsreaktion läuft über einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe des Proteins auf die Carbonylfunktion des Biotinderivates. Bei dieser Reaktion kommt es zur Abspaltung des Sulfo-NHS-Esters und zur Bildung einer Amidbindung. Aufgrund der Stabilität von Amidbindungen wird diese Kopplung häufig zur Derivatisierung von Proteinen genutzt (Streitwieser 1986, Vollhardt 1988).

4.2.3.4.2 Herstellung der Protein-POD-Konjugate

Die Herstellung von Protein-POD-Konjugaten kann mit Hilfe der aktivierten Peroxidase von Pierce erfolgen (Kap. III.2.2.2). Die primären Aminogruppen der Proteine reagieren mit den 1,2-Diolen der aktivierten Oligosaccharidreste unter Bildung von Schiffsbasen. Durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid werden die Schiffsbasen zu sekundären Aminen reduziert, was die Stabilität der Konjugate erhöht (Wilson 1978, Imagawa 1982).

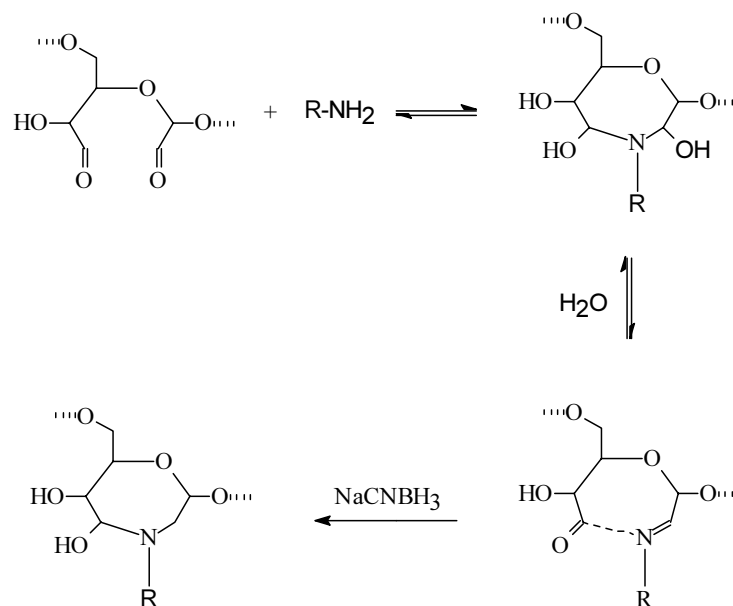
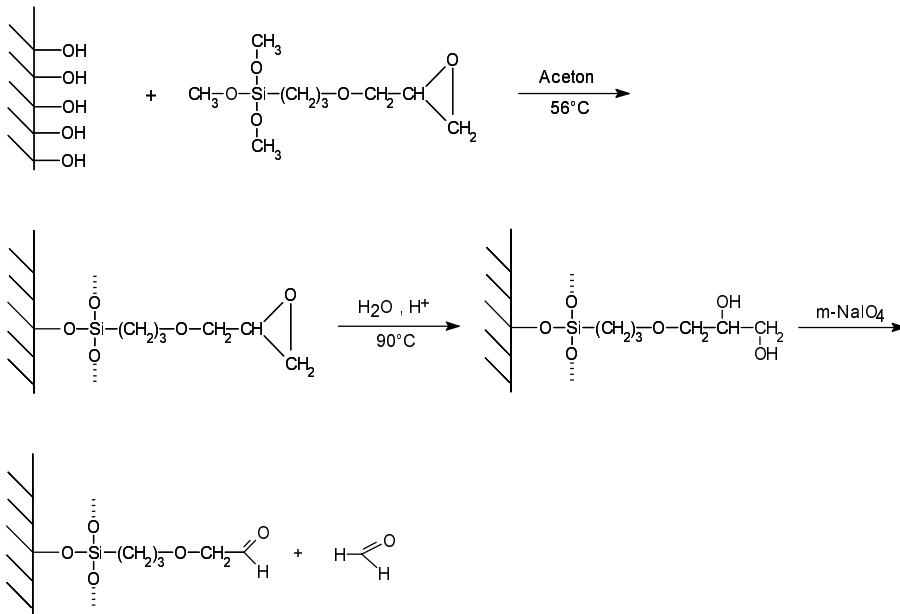


Abb. 16: Kopplung der aktivierten Peroxidase an die primären Aminogruppen der Proteine

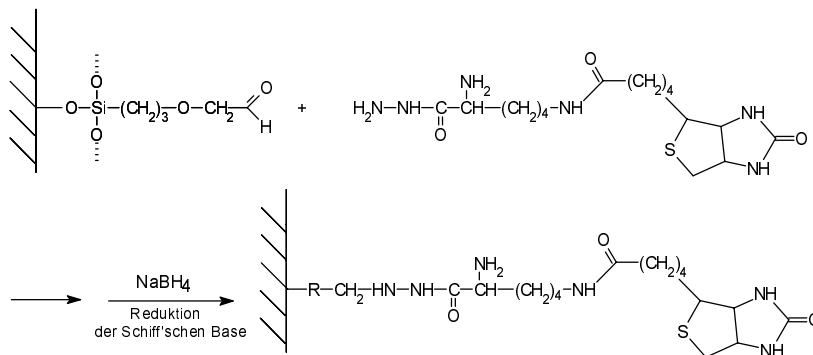
4.2.3.4.3 Herstellung eines Affinitätsreaktors mit biotinyliertem Trägermaterial

Um den biotinylierten Wachstumsfaktor über eine Streptavidinbrücke auf die Oberfläche des Trägermaterials binden zu können, muß diese ebenfalls Biotingruppen tragen. Als Material für die Reaktoren wurden Glas-Beads verwendet, da sich ihre Oberfläche durch einen Silanisierungsschritt leicht modifizieren läßt und dann verschiedene Derivatisierungen möglich sind. Mit dem Silanisierungsreagenz 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan werden Oxirangruppen auf der Trägeroberfläche immobilisiert (Abb.17).

Silanisierung der Oberfläche



Biotinylierung der Oberfläche

**Abb. 17:** Silanisierung und Derivatisierung der verwendeten Glas-Beads.

Durch eine saure Hydrolyse wird der Oxiranring zu einem vicinalen Diol geöffnet (Stiene 1997). In dieser Form ist die derivatisierte Oberfläche stabil und kann monatelang gelagert werden. Natrium-meta-Perjodat oxidiert die benachbarten Hydroxidgruppen zu reaktiven Aldehyden. Bei dieser Reaktion wird Formaldehyd abgespalten.

Mit Hilfe des aldehydspezifischen Biotin-Linkers Biocytin-Hydrazid wird das Trägermaterial biotinyliert (Abb. 17). Biocytin-Hydrazid bindet über seine terminale Amino-Gruppe an die aktivierte Oberfläche. Die entstandenen Schiffischen Basen und die verbliebenen Aldehydgruppen werden durch Natriumcyanoborhydrid reduziert (Kap. II.4.2.3.4.1)

4.3 Auswertung

4.3.1 Affinitätsbestimmung über das thermodynamische Gleichgewicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten von VEGF und seinen Rezeptoren sKDR und sFLT-1 ausführlich untersucht. Bei der Reaktion zwischen Rezeptor (R) und Ligand (L) zu einem gemeinsamen Komplex (RL) handelt es sich um einen reversiblen Vorgang (Gl. 2). Bei ausreichend langer Reaktionszeit, wie sie bei Mikrotiterplattenassays erreicht wird (Kap. III.2.6.1), bildet sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen Komplexbildung und Dissoziation in die Einzelkomponenten (Gl. 5).



$$k_a[R][L] = k_d[RL] \quad (5)$$

Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes (Gl. 6) kann die Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (6)$$

K_D ist die Gleichgewichts- oder Affinitätskonstante, die sich aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a und der Dissoziation k_d ergibt.

Da sich im thermodynamischen Gleichgewicht die Affinitätskonstante durch die Be-

stimmung der Konzentration der Bindungspartner und der Anzahl der gebildeten Komplexe ermitteln läßt, wird sie oft für die Charakterisierung von Bindungssystemen verwendet. Für klassische Bindungsstudien wird einer der Bindungspartner radioaktiv markiert und in variierenden Konzentrationen mit einer konstanten Menge des anderen Bindungspartners inkubiert (Rehm, 1996, Tijssen 1985).

Bei einem 1 : 1 Bindungsverhältnis (Gl. 2) von Rezeptor und Ligand entspricht die Menge des spezifisch gebundenen Liganden $[B]$ der Konzentration der gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe $[RL]$. Die maximal erreichbare Konzentration an gebundenem Liganden $[B_{\max}]$ entspricht in diesem Fall der Gesamtkonzentration des aktiven immobilisierten Rezeptors $[R_0]$. Für den einfachsten Fall, in dem ein Rezeptor einen Liganden bindet, gelten folgende Gleichungen:

$$[R_0] = [R] + [RL] \quad (7)$$

$$[L_0] = [L] + [RL] \quad (8)$$

$$[RL] = [B] \quad (9)$$

$$[R_0] = [B_{\max}] \quad (10)$$

wobei $[L_0]$ die Gesamtkonzentration des eingesetzten Liganden, $[L]$ die Konzentration des freien ungebundenen Liganden und $[R]$ die Konzentration des ungebundenen Rezeptors ist. Mit Hilfe dieser Gleichungen läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz (Gl. 6) die Scatchard-Gleichung (Gl. 13) herleiten. Die Scatchard-Gleichung führt zu einer Linearisierung der Daten und ermöglicht mit einfachen mathematischen Gleichungen die Berechnung der Affinitätskonstanten K_D und der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen $[R_0]$. Setzt man Gleichung 9 in Gleichung 7 ein und löst nach $[R]$ auf, so erhält man :

$$[R] = [R_0] - [B] \quad (11)$$

Ersetzt man nun im Massenwirkungsgesetz (Gl. 6) $[R]$ und $[RL]$, so ergibt sich folgende Gleichung:

$$K_D = \frac{[R_0 - B] * [L]}{[B]} \quad (12)$$

Durch Umformen erhält man die Scatchard-Gleichung (Rehm, 1996, Tijssen 1985):

$$\frac{[B]}{[L]} = \frac{[R_0]}{K_D} - \frac{[B]}{K_D} \quad (13)$$

Trägt man nun $[B]/[L]$ über $[B]$ auf, so erhält man im Idealfall eine Gerade mit der Steigung $1/K_D$ und den Achsenabschnitten :

$$\frac{[B]}{[L]}_{B=0} = \frac{[R_0]}{K_D} \quad (14)$$

$$[B]_{B/L=0} = [R_0] \quad (15)$$

Da sich mit der Scatchard-Gleichung bzw. dem Scatchard-Plot die Affinitätskonstante einfach ermitteln läßt, wird diese Methode sehr häufig angewendet. Doch nicht immer sind die Bindungsverhältnisse so einfach wie eben dargestellt. So können nebeneinander mehrere Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität oder positive bzw. negative kooperative Effekte vorliegen. Unter positiver Kooperation versteht man den Effekt, daß ein bereits gebundener Ligand die Bindung des nächsten Liganden erleichtert. Solche Effekte führen zu Abweichungen der Meßdaten von der Geraden. Liegt eine hoch- und eine niederaffine Bindungsstelle vor, so kann die Auswertung durch die Beschreibung der Kurve mittels zweier Geraden ermöglicht werden, wobei man zwei K_D -Werte erhält (Abb. 18).

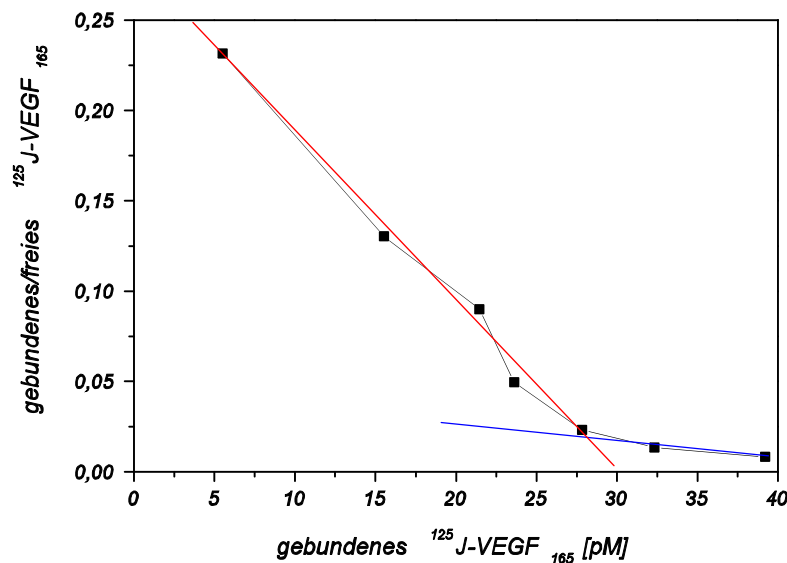


Abb. 18: Scatchard Plot-Analyse der Bindung von VEGF an sFLT-1 in Gegenwart von Heparin. Der Quotient aus gebundenem und freiem VEGF wird über die gebundene Menge aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Kurve, durch die zwei Geraden gelegt und damit zwei K_D -Werte bestimmt werden können.

Scatchard-Gleichungen zur Beschreibung heterogener oder mehrerer unterschiedlicher Bindungsstellen an einem der beteiligten Moleküle sind sehr komplex und haben keine praktische Bedeutung. In diesen Fällen oder bei positiver bzw. negativer Kooperation haben sich andere Berechnungsmethoden, wie z.B. die Adair-Gleichung, bewährt (Segel 1975, Cornish-Brown 1995) :

$$Y_S = \frac{\frac{[L]}{K_{D1}} + \frac{[L]^2}{K_{D1}K_{D2}}}{1 + \frac{2[L]}{K_{D1}} + \frac{[L]^2}{K_{D1}K_{D2}}} \quad (17)$$

wobei Y_S der Anteil der belegten Bindungsplätze bezogen auf die vorhandene Gesamtzahl ist.

Da es sich bei VEGF (L) um einen dimeren Wachstumsfaktor mit zwei identischen Bindungsstellen handelt, sind bei ausreichender Nähe der Rezeptoren (R) zueinander neben bzw. nach einer 1 : 1 Reaktion (Gl.2) noch weitere Reaktionen (Gl. 18, Gl. 19)

möglich. Daher wurde der K_D -Wert sowohl mit Hilfe der Scatchard-Plot-Analyse als auch mit der Adair-Gleichung bestimmt.



4.3.2 Kinetische Untersuchungen

Der Einsatz integrierter optischer Sensoren, wie z.B. des BIAcores (Kap. II. 4.2.2) oder eines Gitterkopplers (Polzius 1995), ermöglicht die Beobachtung der Anlagerung des Wachstumsfaktors an den Rezeptor sowie des anschließenden Zerfalls des Komplexes direkt in Abhängigkeit von der Zeit und damit die Bestimmung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines BIAcore-Gerätes die Assoziationskonstante k_a , die Dissoziationskonstante k_d und die Affinitätskonstante K_D ermittelt (Kap. III.2.8.1, IV.2.1). In Abbildung 10 ist der Kurvenverlauf einer solchen Messung schematisch dargestellt (Kap. II.4.2.2.1). Die gemessene Signalthöhe S in RU (Resonance Units) ist der Konzentration der gebundenen Liganden und somit der Anzahl der gebildeten Komplexe $[RL]$ proportional. Bei einer 1 : 1 Reaktion (Gl. 2) der Bindungspartner gelten die in Kapitel II.4.3.1 beschriebenen Gleichungen für die Gleichgewichtslage. Assoziation (Gl. 20) und Dissoziation (Gl. 21) können wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{-d[RL]}{dt} = k_d[RL] \quad (20)$$

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a[R][L] \quad (21)$$

Berücksichtigt man, daß bereits gebildete Komplexe auch während der Assoziationszeit wieder zerfallen, so muß Gleichung 20 ergänzt werden:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a[R][L] - k_d[RL] \quad (22)$$

Die Konzentration an noch freien Rezeptoren $[R]$ entspricht der Differenz zwischen der Gesamtmenge der immobilisierten Rezeptoren $[R_0]$ und der Menge an gebildeten Komplexen $[RL]$.

$$[R] = [R]_0 - [RL] \quad (23)$$

Die Menge der vorhandenen Komplexe $[RL]$ wird durch die Signalhöhe S und R_0 durch das maximale Signal S_{\max} wiedergegebenen. Ersetzt man $[RL]$ durch S , $[R_0]$ durch S_{\max} und setzt Gleichung 23 in Gleichung 22 ein, so erhält man für die Assoziation zu Beginn:

$$\frac{dS}{dt} = k_a[L_0](S_{\max} - S) - k_dS \quad (24)$$

dS/dt ist die zeitabhängige Signaländerung und $[L_0]$ die Ausgangskonzentration des Liganden. Durch Umformen ergibt sich :

$$\frac{dS}{dt} = k_a[L_0]S_{\max} - (k_a[L_0] + k_d)S \quad (25)$$

Trägt man die Signaländerung dS/dt gegen das Signal S auf, so erhält man bei reaktionskontrollierten Wechselwirkungen eine Gerade mit der Steigung

$$m = -(k_aL_0 + k_d) \quad (26)$$

und dem Achsenabschnitt :

$$\frac{dS}{dt}_{S=0} = k_a[L_0]S_{\max} = k_a[L_0][R_0] \quad (27)$$

Ist S_{\max} bekannt, so ist es möglich, mit der Aufzeichnung einer einzigen Anlagerungskurve den Achsenabschnitt und daraus k_a und dann die Steigung m und daraus k_d zu ermitteln.

Bei instabilen Komplexen mit einem hohen k_d -Wert läßt sich S_{\max} experimentell nur ungenau bestimmen. Bei der Aufnahme nur einer Anlagerungskurve kann es sein, daß Effekte, wie z.B. Massentransport, nicht bemerkt werden. Daher wurden für diese Arbeit die kinetischen Konstanten durch die Aufnahme mehrerer Anlagerungskurven mit unterschiedlicher Ligandkonzentration $[L_0]$ und unterschiedlichen Rezeptormengen $[R_0]$ auf der Sensoroberfläche bestimmt (Karlsson 1991). Jede Kurve wird als dS/dt gegen S aufgetragen und die Steigung (Gl. 26) bestimmt. Trägt man die Steigung m (Gl. 26) gegen die Konzentration $[L_0]$ auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung k_a und dem Y-Achsenabschnitt k_d . Für viele Komplexe gilt: $k_a [L_0] \gg k_d$.

Die Genauigkeit der Bestimmung bei kleinen k_d -Werten ist bei diesem Verfahren jedoch unzureichend (Karlsson 1991, BIAtechnology Handbook 1994). Die Dissoziationskonstante k_d sollte darum aus dem Kurvenverlauf in der Dissoziationsphase bestimmt werden. Ersetzt man in der Dissoziationsgleichung (Gl. 21) die Komplexmenge $[RL]$ ebenfalls durch die Signalthöhe S , so erhält man:

$$\frac{dS}{dt} = -k_d S \quad (28)$$

Integration und Auflösen nach S führen zu folgender Gleichung:

$$S_t = S_0 * e^{-k_d(t-t_0)} \quad (29)$$

bzw.

$$\ln \frac{S_0}{S_t} = k_d(t-t_0) \quad (30)$$

S_t ist die Signalthöhe zur Zeit t und S_0 ist die Signalthöhe einer gewählten Zeit t_0 . Der Auftrag von $\ln(S_0/S)$ über $t-t_0$ führt zu einer Geraden mit der Steigung k_d . Der Quotient

aus k_d/k_a ergibt wiederum die Affinitätskonstante K_D . Will man K_D direkt ohne die Geschwindigkeitskonstanten bestimmen, so ist dies relativ einfach mit einer Gleichung analog zur Scatchard-Gleichung (Gl. 13) möglich:

$$\frac{S_{GGW}}{L} = \frac{S_{\max}}{K_D} - \frac{S_{GGW}}{K_D} \quad (31)$$

Trägt man den Quotienten aus der Signalthöhe im Gleichgewicht S_{GGW} und Ligandenkonzentration $[L]$ über S_{GGW} auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung $1/K_D$. Der Schnittpunkt mit der X-Achse entspricht S_{\max} .

Da bei Messungen am BIAcore einer der Bindungspartner auf der Sensoroberfläche immobilisiert ist, liegt eine heterogene Bindungsreaktion vor. Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit k_a bzw. k_d kann durch die Geschwindigkeit des Massentransports k_m limitiert werden. Der Ligand (L) muß, bevor es zur Komplexbildung kommen kann, in die Nähe der Rezeptoren (R) auf der Sensoroberfläche gebracht werden.



wobei L_L der Ligand in Lösung und L_{ob} der Ligand an der Oberfläche ist. Der Transport J des Liganden wird durch die Geometrie der Fließzelle κ , den Diffusionskoeffizienten D , die Fließrate f und die Ligandenkonzentration $[L]$ bestimmt (Matsuda 1967).

$$J = \kappa [L] D^{2/3} f^{1/3} \quad (33)$$

Um den Effekt der Massentransportlimitierung zu vermeiden bzw. zu minimieren, muß der Transport der Liganden schnell erfolgen und die Bindungsrate möglichst gering sein. Eine höhere Transportgeschwindigkeit J kann durch die Erhöhung der Ligandenkonzentration $[L]$ und der Fließrate f erreicht werden (Gl. 33). Die Bindungsrate ist von der Anzahl der Bindungspartner auf der Sensoroberfläche abhängig. Durch eine geringe Rezeptordichte kann sie reduziert werden und damit das Problem der Massentransportlimitierung.

4.3.3 Auswertung und Charakterisierung der Rezeptorassays

Für den Nachweis von biologisch aktivem VEGF wurden Rezeptorassays auf der Mikrotiterplatte und im BIAcore entwickelt. Mit Hilfe einer VEGF-Standardkurve wurden die Konzentration des Wachstumsfaktors und die für einen Assay charakteristischen Parameter bestimmt. Trägt man die erhaltenen Signale im halblogarithmischen Maßstab gegen die Konzentration auf, so ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf (Abb. 19).

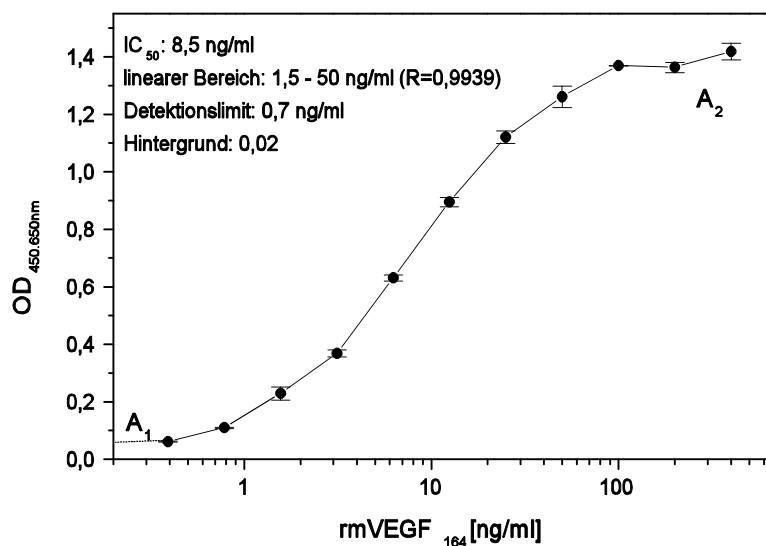


Abb. 19: rmVEGF-Standardreihe auf einer mit sFLT-1 und Heparin beschichteten Platte. Der Nachweis des gebundenen Wachstumsfaktors erfolgt über Anti-mVEGF und Anti-Ziege-POD (Kap. III.2.6.2)

Der Wendepunkt der Kurve wird Testmittelpunkt oder IC₅₀ genannt und ist ein wichtiger Assayparameter. Je kleiner der IC₅₀-Wert, desto größer ist die Affinität zwischen den Bindungspartnern und desto niedriger liegt der Konzentrationsbereich des Assays. An diesem Punkt der halbmaximalen Sättigung, an dem die Hälfte der vorhandenen Bindungsplätze besetzt ist, entspricht die Konzentration des Wachstumsfaktors der Affinitätskonstanten K_D.

Mathematisch wird der IC_{50} -Wert mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung (Gl. 34) bestimmt (Deshpande 1996, Tijssen 1985):

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{1 + (x/c)^h} + A_2 \quad (34)$$

wobei y das Signal, x die Konzentration des Liganden, A_1 die Asymptote bzw. das Signal im Bereich des Nullwertes, A_2 die Asymptote bzw. das Signal im Bereich der Sättigung, h die Steigung im Testmittelpunkt und c die Ligandkonzentration im Testmittelpunkt bzw. der IC_{50} -Wert ist.

Sowohl die 4-Parameter-Gleichung als auch die Gleichung der Geraden durch den linearen Bereich der Standardkurve können für die Konzentrationsbestimmung unbekannter Proben benutzt werden. Die Steigung m und der Achsenabschnitt b der Geraden können durch einen linearen Fit ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Konzentrationsbestimmungen mit der Geradengleichung.

Um verschiedene Standardkurven direkt miteinander vergleichen zu können, ist eine Standardisierung der Werte notwendig (Gl. 35).

$$\%B/B_0 = \frac{A - A_2}{A_1 - A_2} * 100 \quad (35)$$

Dabei ist A das Signal des Liganden und A_1 und A_2 sind die Signalthöhe des Nullwertes bzw. der Sättigung.

Das Detektionslimit ist ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Assays. Darunter versteht man die niedrigste nachweisbare Konzentration, bei der sich das Signal noch um die doppelte Standardabweichung vom Nullwert unterscheiden muß (Deshpande 1996).

III Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Chemikalien

Acryl/-Bisacrylamid (30%): Roth, Karlsruhe

APS (Ammoniumpersulfat): Sigma, St. Louis, USA

Biocytin-LC-Hydrazid: Pierce, Rockford, IL, USA

Chloramin: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Ethanolamin: Sigma, St. Louis, USA

DMF (Dimethylformamid): Fluka, Buchs, Schweiz

GOPS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan): ABCR Chemie, Karlsruhe

Guanidin-Hydrochlorid: Fluka, Buchs, Schweiz

Harnstoff: Fluka, Buchs, Schweiz

Heparin, Sao Paulo Fraktion: Dr. Iberg, LaRoche, Schweiz

HEPES (2-(4-Hydroxyethyl-1-piperazino)-ethanessigsäure): Serva, Heidelberg

Hydrochinon: Merck, Darmstadt

Lysin: Sigma, St. Louis, USA

Mercaptoethanol: Fluka, Buchs, Schweiz

Na¹²⁵J : Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden

Na-Metabisulfid: Sigma, St. Louis, USA

aktivierte Peroxidase: Pierce, Rockford, IL, USA

P20: BIAcore AB, Uppsala, Schweden

Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V: Sigma, St. Louis, USA

SDS (Natriumdodecylsulfat): Sigma, St. Louis, USA

Streptavidin: Pierce, Rockford, IL, USA

Sulfo-NHS-LC-Biotin: Pierce, Rockford, IL, USA

TEMED (Tetramethyldiamin): Sigma, St. Louis, USA

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin): Boehringer, Mannheim

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat): Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid 30 %: Merck, Darmstadt

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden Produkte der Firmen Sigma (St. Louis, USA) und Fluka (Buchs, Schweiz) in p.A. Qualität verwendet.

1.2 Wachstumsfaktoren und Rezeptoren

sFLT-1, sKDR, rhVEGF₁₆₅ und rmVEGF₁₆₄ wurden rekombinant in Insektenzellen mit dem Baculovirus Expressionssystem selbst hergestellt und gereinigt (Kap. III.2.1) oder von H. Weich oder C. Hornig (beide GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt. rhVEGF₁₂₁ aus *E. coli* wurde von R&D Systems (Wiesbaden) bezogen oder von R. Birkenhäger oder U. Kärst (beide GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt. PlGF-2 (Insektenzellen, Baculovirus Expressionssystem) wurde von Herrn H. Weich zur Verfügung gestellt.

1.3 Antikörper

Anti-VEGF-Antikörper:

K6, Anti-VEGF (polyklonal, Kaninchen): H. Weich, GBF, Braunschweig

K7, Anti-VEGF (polyklonal, Kaninchen): H. Weich, GBF, Braunschweig

Anti-hVEGF (monoklonal, Maus, Klon 26503.11, 500 µg/ml): R&D Systems, Wiesbaden

Anti-hVEGF (monoklonal, Maus, Klon 14-124, 100 µg/ml): Calbiochem, Bad Soden

Anti-hVEGF-Biotin (polyklonal, Ziege, 50 µg/ml): R&D Systems, Wiesbaden

VG 76e, Anti-hVEGF (monoklonal, Maus, 1,9 mg/ml): R. Bicknell, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

R4.6.1, Anti-hVEGF (monoklonal, Maus): Genentec, L.A., USA

Anti-mVEGF (polyklonal, Ziege, 100 µg/ml): Sigma, Saint Louis, MI, USA

Anti-KDR-Antikörper :

212, Anti-KDR (polyklonal, Kaninchen): H. Weich, GBF, Braunschweig

260.4, Anti-KDR (monoklonal, Maus): H. Weich, GBF, Braunschweig

275.11, Anti-KDR (monoklonal, Maus): H. Weich, GBF, Braunschweig

Anti-FLT-1 Antikörper :

FLT-11, Anti-FLT-1 (monoklonal, Maus): H. Weich, GBF, Braunschweig

sekundäre Antikörper:

Anti-Ziege/Schaf-POD (monoklonal, Maus, Klon GT-43): Sigma, St. Louis, USA

Anti-Maus-POD (polyklonal, Schaf, Fab-Fragmente): Boehringer, Mannheim

Anti-Kaninchen-POD (polyklonal, Ziege): Promega, Madison, WI, USA

Anti-Ziege-AP (monoklonal, Maus, Klon GT-34): Sigma, St. Louis, USA

Anti Maus IgG (H+L)-AP (polyklonal, Ziege): Promega, Madison, WI, USA

Anti-Kaninchen IgG (FC)-AP (polyklonal, Ziege): Promega, Madison, WI, USA

1.4 Hergestellte Konjugate

K6-POD (100 µg/ml)

VG76e-POD (820 µg/ml)

rmVEGF₁₆₄-POD (830 µg/ml)

rhVEGF₁₂₁-Biotin (145 µg/ml)

¹²⁵J-rhVEGF₁₆₅ (1 - 1,4 µg/ml)

1.5 Medien

DMEM: Gibco BRL, Karlsruhe

SF900II: Gibco BRL, Karlsruhe

TC 100: Gibco BRL, Karlsruhe

EGM: Gibco BRL, Karlsruhe

Die in Kapitel II.2.10.2 erwähnten Medien YPD und YTM₄ wurden von J. v.d. Heuvel und K. Eckert für die Fermentation von rhVEGF₁₆₅ verwendet. Die Zusammensetzung der Medien wurde von Invitrogen und Brierley beschrieben (Invitrogen (a), Brierley 1990).

1.6 Zellen

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (MVEC): Clonetics, San Diego, USA

Sf158 Insektenzellen: Invitrogen, San Diego, USA

High Five (H⁵) Insektenzellen: Invitrogen, San Diego, USA

1.7 Sonstige Substanzen

Exon 6 Peptid (CGKGQKRKKSRYK): Saxon Biochemical, Hannover

Exon 7 Peptid (CSERRKHLFVQDPQT): Saxon Biochemical, Hannover

SA-PolyHRP: CLB, Amsterdam, Niederlande

1.8 Puffer und Lösungen

Bei allen Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent. Gewichtsprozent werden mit (w/v) gekennzeichnet.

VEGF Reinigung:

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,4

Elutionspuffer: 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4

sFLT-1 Reinigung:

NaP-Puffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7

Puffer A: 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7

Puffer B: 10 mM Natriumphosphatpuffer, 2 M NaCl, pH 7

Alle Natriumphosphatpuffer wurden durch Mischen von 0,5 M NaH_2PO_4 und 0,5 M Na_2HPO_4 auf pH 7 eingestellt und dann auf die gewünschte Molarität verdünnt.

sKDR Reinigung:

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8

Puffer B: Puffer A + 0,5 M Methyl-D- mannopyrosid, pH 5,5

Konjugatherstellung:

NaP-Puffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

PBS: 0,1 M PBS (90 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 1,369 M NaCl, 0,027 M KCl), pH 7,2

Reduktionspuffer: 5 M NaCNBH_3 im 1 M NaOH

Quenchingpuffer: 3 M Ethanolamin pH 9

Mikrotiterplattenassays :

Carbonatpuffer:	0,15 M Na ₂ CO ₃ , 0,35 M NaHCO ₃ , pH 9,6
10 x PBS:	0,1 M PBS (90 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM KH ₂ PO ₄ , 1,369 M NaCl, 0,027 M KCl)
PBS:	10 x PBS 1 : 10 verdünnen, mit HCl auf pH 7,2 einstellen
PBST:	PBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2
Blockpuffer:	PBST, 1 % (w/v) BSA, pH 7,2
Bindepuffer:	DMEM, 1 mg/ml BSA, 20 mM Hepes, pH 7,4
Waschpuffer 1:	PBST, pH 7,2
Waschpuffer 2:	Waschpuffer 1, 500 mM NaCl
Lysepuffer:	0,3 M NaOH, 0,1 % SDS
Acetatpuffer:	0,1 M Natriumacetat mit 1 M Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen
TMB-Lösung:	160 µl TMB (Stammlösung 6 mg/ml in DMSO) und 40 µl 1% ige H ₂ O ₂ -Lösung in 10 ml Acetatpuffer
Stopplösung:	1 M H ₂ SO ₄

Ebenfalls verwendet wurden der HPE-Puffer von CLB (Amsterdam, Niederlande) und das BM Chemilumineszenz ELISA Reagenz (Boehringer, Mannheim), das sich aus Luminol und 4-Iodophenol als Enhancer zusammensetzt.

Western Blot :

Transferpuffer:	20 % Methanol, 50 mM Tris, 40 mM Glycin, 1 mM SDS
TBS:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8
TBST:	TBS, 0,05 % Tween 20
Assaypuffer :	TBS, 10 % Milch (0,1% Fett)
Ponceau S-Lösung:	0,1 % Ponceau S, 40 % Methanol, 15 % Essigsäure, 44,9 % deion. Wasser

Western Blue stabilized Substrate: Promega, Madison, WI, USA

Gelelektrophorese:

- 10 x Laufpuffer: 0,25 M Tris-Base, 1,9 M Glycin, 35 mM SDS
- Probenpuffer 1: 1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,6 ml Glycerin, 1,6 ml 10 % SDS,
(nicht reduzierend) 0,2 ml 0,05 % Bromphenolblau, 4 ml deion. Wasser
- Probenpuffer 2: 50 µl β-Mercaptoethanol auf 950 µl 4 x Probenpuffer 1
(reduzierend)

Färben mit den 2D-Silver Stain II, Daiichi Kit (Daiichi, Tokio, Japan)

- Fixierlösung 1: 20 ml deion. Wasser, 25 ml Methanol, 5 ml Essigsäure
- Fixierlösung 2: 27,5 ml deion. Wasser, 15 ml Methanol, 5 ml Essigsäure, 2,5 ml
Reagenz 1
- Pretreatmentlösung: 22,5 ml deion. Wasser, 25 ml Methanol, 2,5 ml Reagenz 2
- Färbelösung: 45 ml deion. Wasser, 2,5 ml Färbelösung A, 2,5 ml Färbelösung B
(Reagenz 3 und 4)
- Entwickler: 47,5 ml deion. Wasser, 2,5 ml Entwickler (Reagenz 5)
- Stopplösung: 2,5 ml Stopper (Reagenz 6)

Silberfärbung mit dem PhastSystem (Pharmacia, Uppsala Schweden)

- Fixierlösung: 20 ml Glutaraldehyd 25 %, 285 ml Ethanol, 15 ml Isopropanol,
3 g Natriumacetat, 0,65 g Natriumthiosulfat zu 1000 ml mit
deion. Wasser aufgefüllt
- Waschlösung 1: 100 ml Ethanol, 50 ml Essigsäure zu 1000 ml deion. Wasser aufge-
füllt
- Waschlösung 2: deion. Wasser
- Färbelösung: 80 ml deion. Wasser, 1,6 ml Silbernitratlösung 20 % (w/v)
- Entwickler: 25 g Natriumcarbonat, 0,4 ml Formaldehyd 35 % zu 1000 ml mit
deion. Wasser aufgefüllt
- Stopplösung: 16 g Natriumthiosulfat, 37 g Tris-HCl, auf 1000 ml deion. Wasser
- Schutzlösung: 50 ml Glycerin zu 1000 ml mit deion. Wasser aufgefüllt

BIAcore:

HBS:	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,05 % P20, pH 7,4
Assaypuffer:	HBS
Acetatpuffer:	0,1 M Natriumacetat mit 1 M Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen
Regenerierung:	10 mM HCl 5 mM NaOH HBS, 1 M NaCl

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden filtriert (Nitrozellulosefilter, \varnothing 0,2 μ m) und entgast.

FIA:

10 x PBS:	75 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , 1,45 M NaCl
PBS:	10 x PBS 1/10 verdünnen, pH 7.2
PBST:	PBST, 0,05 % Tween 20
Assaypuffer 1:	PBST, 0,5 % BSA
Assaypuffer 2:	PBST, 0,5 M NaCl
KPi-Puffer:	0,1 M KPi pH 5,5 (hergestellt durch Mischen von 0,1 M K_2HPO_4 und 0,1 M KH_2PO_4)
Carrier A:	KPi-Puffer, 2 mM H_2O_2
Carrier B:	KPi-Puffer, 2 mM p-Hydrochinon
Regenerierlösung:	6 M Guanidin-HCl pH 0,5
Streptavidinlösung:	2 μ g/ml Streptavidin (2 mg/ml Stocklösung) in PBST

Alle Puffer wurden filtriert (Nitrozellulosefilter, \varnothing 0,2 μ m) und entgast. Die Carrier wurden in dunklen Flaschen bei 4°C aufbewahrt. Die verwendeten Carrier waren maximal 3 Tage alt.

1.9 Geräte und sonstige Materialien

Mikrotiterplattenassays:

MaxiSorb Mikrotiterplatten: Nunc, Roskilde, Dänemark

Black FluoroNunc Mikrotiterplatten: Nunc, Roskilde, Dänemark

ELISA Reader: Microtiterplate Reader V_{max}, Molecular Devices, USA

Luminometer: Berthold, Wildbach

ELISA-Washer: Nunc-Immunowash 8, Nunc, Roskilde, Dänemark

24-Well Zellkulturplatten: Greiner, Frickenhausen

Wizzard Gamma-Counter: EG&G Wallac, Turku, Finnland

Western Blot :

Immobilon P Membran: Millipore, Bedford, USA

Whatman Filterpapier: Whatman, Maidstone, UK

Trans Blot SD System: BioRad, München

Gelelektrophorese:

Mini-Protean II: BioRad, München

Power Pack 25: Biometra, Göttingen

PhastSystem: Pharmacia, Uppsala, Schweden

PhastGel 8 - 25 %: Pharmacia, Uppsala, Schweden

PhastGel SDS Pufferstreifen: Pharmacia, Uppsala, Schweden

BIACore:

BIACore 2000: Biacore AB, Uppsala, Schweden

CM5 Sensorchips (res. grade): Biacore AB, Uppsala, Schweden

Amino-Kopplungskit: Biacore AB, Uppsala, Schweden

Fließinjektionssystem:

Elektrochemischer Detektor HP-1049A: Hewlet Packard, Bad Homburg

Ag/AgCl-Bezugselektrode: Ingold Meßtechnik GmbH, Steinbach

Potentiostat VA641: Methrom, Herisau, Schweiz

3/2-Wege-Ventile LFAA: Lee Co., Conneticut, USA

6-Wege-Selektionsventile: Latek, Heidelberg

Gilson Probenwechsler M221: Abimed, Langenfeld

Gilson Pumpe Minipuls: Abimed, Langenfeld

Peristaltische Pumpen: Meredos, Nörten Hardenberg

Pumpenschläuche: BLB, Braunschweig

Relaiskasten: GBF, Braunschweig

486 PC 66MHz, 250 MB Festplatte: Delos, Braunschweig

CIO-DAS-08 PGH AD Wanderkarte: Mansfeld, MA, USA

ERB-24 Relaiskarte: Metrabyte Corp. Taunton, MAA, USA

IO-Interface 24 Bit PIO-12: Metrabyte Corp. Taunton, MAA, USA

Säulen bzw. Säulenmaterial:

Heparin-Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

HiTrap®Heparin-Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

ConA-Sepharose (lose): Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

PD 10: Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Zentrifugen:

Megafuge 1.0 R: Heraeues/Sepatech, Hannover

RC5C, Rotoren SLA 3000 und GS-3: Sorvall Instruments, Du Pont, Bad Homburg

Zentrifuge 5414: Eppendorf, Hamburg

Sonstiges:

Cell-Scraper: Nunc, Roskilde, Dänemark

Gewebekulturschalen: Greiner, Frickenhausen

Glas-Beads: Sigma, St. Louis, USA

Nitrozellulose-Filter (\varnothing 0,2 bzw. 0,45 μm): Sartorius, Göttingen

Minisart[®] (\varnothing 0,2 μm): Sartorius, Göttingen

BCA-Assay: Pierce, Rockfort, IL, USA

hVEGF Quantifizierungs-Assay: R&D Systems, Wiesbaden

BioLogic: BioRad, München

Photometer: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Amicon Rührzelle: Amicon Grace Company 8400, Berverly, MA, USA

Inkubator B5042: Heraeus, Hanau

2 Methoden

2.1 Herstellung und Reinigung verschiedener Proteine

2.1.1 Allgemeine Vorschrift zur Herstellung rekombinanter Proteine mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Insektenzellen

Für die rekombinante Herstellung von VEGF und seinen löslichen Rezeptoren sFLT-1 und sKDR wurden entweder Sf158 oder High Five (H⁵) Insektenzellen und das Baculovirus Expressionssystem verwendet (Invitrogen (b), Gruenwald 1993). Bei beiden Zelltypen handelte es sich um adhärenz wachsende Zellen. Zunächst mußte eine ausreichende Menge Zellen kultiviert werden. Anschließend wurden diese mit dem Baculovirus, der das gewünschte Gen z.B. für sKDR enthielt, infiziert. Am Beispiel der sKDR Herstellung soll hier kurz die Kultivierung und die Infektion der Zellen mit dem Virus beschrieben werden.

2.1.1.1 Herstellung von sKDR

High Five Insektenzellen wurden in Gewebekulturschalen in TC 100 Medium mit 4 % FCS und Gentamycin als Antibiotikum kultiviert. Die Kontrolle der Zellen erfolgte regelmäßig unter dem Mikroskop. Waren die Platten zu 70 % mit Zellen bewachsen (konfluent), so wurden die Zellen aufgeteilt. Alle Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Vermehren der Zellen:

1. Bis auf ca. 10 ml wurde das Medium von den Gewebekulturschalen entfernt.
2. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Cell-Scraper von der Oberfläche gelöst.
3. Zusammen mit dem restlichen Medium wurden die Zellen in eine Pipette gezogen und die Platte mehrfach damit gewaschen.
4. Anschließend wurden die Zellen und das Medium auf 3 bis 4 neue Gewebekulturschalen verteilt, in denen sich bereits ca. 20 ml TC 100 Medium befand und bei 27 °C für 2 bis 3 Tage in den Inkubator gestellt.
5. Bei einer 70 % igen Konfluenz wurden die Zellen erneut wie beschrieben aufgeteilt.

Die Insektenzellen wurden so lange geteilt und vermehrt bis eine ausreichende Menge (50 - 200 Gewebekulturschalen) vorhanden war. Anschließend wurden sie mit dem Baculovirus infiziert.

Infizieren der Zellen:

1. Das Medium wurde vorsichtig von den Gewebekulturschalen gesaugt.
2. Die Schale wurde einmal mit PBS-Puffer gewaschen, um Serumreste zu entfernen, da die Proteine im Serum bei der Aufreinigung von sKDR stören würden.
3. 5 ml Virusstock wurden auf die Zellen gegeben und für 1 bis 2 Stunden bei RT

inkubiert. Die Schalen wurde gelegentlich geschwenkt.

4. Anschließend wurden ca. 20 ml serumfreies SF900II Medium dazugegeben und die infizierten Zellen für 3 bis 5 Tage bei 27 °C in den Inkubator gestellt.
5. Nach dem Lösen der infizierten Zellen von der Oberfläche wurden die Überstände vereinigt und bei 4 °C für 15 min bei 7000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Überstände eingefroren oder direkt aufgearbeitet.

2.1.2 Reinigung von VEGF

rhVEGF₁₆₅ und rmVEGF₁₆₄ wurden mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Sf158 Insektenzellen hergestellt (Fiebich 1993). Als Medium diente serumfreies SF900II. Die gewonnenen Zellüberstände wurden sofort eingefroren und später in kleineren Portionen von 500 bis 1000 ml gereinigt.

Reinigungsprotokoll:

1. Die eingefrorenen Insektenzellüberstände wurden aufgetaut und mit 1 M HCl auf pH 3,5 eingestellt.
2. Der Überstand wurde auf 250 ml Zentrifugengefäße verteilt und mit 8500 upm bei 4 °C über 20 min in einem Sorvall-GS-3 Rotor zentrifugiert, um die durch die pH-Wertverschiebung ausgefallenen Proteine zu entfernen.
3. Die nun erhaltenen Überstände wurden vorsichtig dekantiert, vereinigt und mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt.
4. Mit Hilfe einer 5 M NaCl-Lösung wurde die Salzkonzentration im Medium von 150 mM auf eine Gesamtkonzentration von 400 mM NaCl gebracht.
5. Durch Filtration (\varnothing 0,45 μ m, Nitrozellulosefilter) wurden mögliche Niederschläge und Partikel entfernt.
6. Der Überstand wurde über Nacht bei 4 °C mit einer Fließrate von 1 - 2 ml/min auf eine 1 ml Heparin-Sepharose-Säule gegeben, die zuvor mit Puffer A (20 mM

Tris-HCl pH 7,4, 0,4 M NaCl) äquiliert wurde. Bei Volumina, die als größer 800 ml waren, wurden zwei Säulen hintereinander geschaltet. 1 ml Heparin-Sepharose kann ca. 4 mg VEGF binden.

7. Anschließend wurde die Säule mit Hilfe einer Spritze mit 10 ml Puffer A gewaschen.
8. Das gebundene Protein wurde mit 12 x 1 ml Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl) eluiert. Dies geschah ebenfalls mit einer Spritze.
9. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE auf Proteingehalt und Reinheit geprüft. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit dem BCA-Assay von Pierce bestimmt.
10. Die VEGF enthaltenden Fraktionen wurden vereint, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

2.1.3 Reinigung von sFLT-1

Der lösliche VEGF-Rezeptor sFLT-1 wurde mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in Sf158 oder High Five Insektenzellen hergestellt. Als Medium diente serumfreies SF900II. Die gewonnenen Zellüberstände wurden sofort eingefroren und später in kleineren Portionen (500 - 1000 ml) gereinigt.

Reinigungsprotokoll:

1. Die eingefrorenen Überstände wurden aufgetaut und 1 : 2 mit 20 mM NaP-Puffer pH 7 verdünnt.
2. Mit Hilfe einer 5 molaren NaCl-Lösung wurde die Salzkonzentration im Medium (unverdünnt 150 mM) auf eine Gesamtkonzentration von 500 mM NaCl gebracht.
3. Anschließend wurde der pH-Wert auf pH 7 eingestellt und der Überstand durch einen Nitrozellulosefilter (\varnothing 0,45 μ m) filtriert.

4. Der so vorbereitete Überstand wurde über Nacht bei 4 °C mit einer Fließrate von 1 - 2 ml/min auf eine 1 ml HiTrap[®] Heparin-Sepharose Säule gegeben. Zuvor war die in Ethanol gelagerte Säule mit dest. Wasser gewaschen und dann mit NaP-Puffer äquilibriert worden.
5. Die beladene Säule wurde in das BioLogic Chromatographie System von BioRad eingebaut und bei einer Fließrate von 1 ml/min mit 10 mM NaP-Puffer pH 7 und 500 mM NaCl (25 % Puffer B und 75 % Puffer A) gewaschen bis die Basislinie stabil war.
6. Die Elution erfolgte durch die schrittweise Erhöhung der NaCl-Konzentration (steigender Anteil von Puffer B) auf 2 M. Die Fließrate betrug 1 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.
7. sFLT-1 wurde bei ca. 0,8 M NaCl eluiert. Die Fraktionen aus diesem Peak und Kontrollfraktionen wurden mit SDS-Page und Western Blot auf ihren sFLT-1 Gehalt und ihre Reinheit geprüft. Mit Hilfe des BCA-Assays von Pierce wurde die Gesamtproteinmenge bestimmt.
8. Die sFLT-1 enthaltenden Fraktionen wurden vereint, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Bei den ersten Aufreinigungen war der Zellüberstand durch eine 35 - 65 % ige Ammoniumsulfatfällung vorgereinigt worden (Roeckl 1998). Nachdem das Reinigungsprotokoll für sFLT-1 von C. Hornig (Hornig 2000) optimiert worden war, entfiel dieser Schritt.

2.1.4 Reinigung von sKDR

Wie unter 2.1.1.1 beschrieben, wurde sKDR mit Hilfe des Baculovirus in High Five Insektenzellen exprimiert. Die Reinigung der Überstände erfolgte im Batch-Verfahren in 50 ml Falcon-Röhrchen mit loser ConA-Sepharose (modifiziert nach Roeckel 1998).

Reinigungsprotokoll:

1. Die Zellkulturüberstände wurden aufgetaut und mit Hilfe der Rührzelle von Amicon unter Druck bei 4 °C über Nacht eingengt. Das Volumen wurde dabei von ca. 2 l auf 200 ml reduziert.
2. Der aufkonzentrierte Überstand wurde gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0 (Puffer A) dialysiert.
3. Je 5 ml ConA-Sepharose Material wurden in die Falcon Röhrchen gegeben. Um das Säulenmaterial zu äquilibrieren, wurde es zweimal für 10 min mit 50 ml Puffer A gewaschen.
4. 50 ml des aufkonzentrierten Überstandes wurden pro Röhrchen hinzu gegeben und unter Schütteln 1 h bei RT inkubiert.
5. Anschließend wurde das ConA-Sepharose Material zweimal mit Puffer A gewaschen.
6. Durch Waschen mit sechsmal 5 ml Puffer B (Puffer A + 0,5 M Methyl-D-Mannosepyranosid und pH 5,5) wurde das gebundene Protein eluiert. Bei jedem Elutionsschritt wurde das ConA-Sepharose Material 10 min bei RT mit Puffer B inkubiert.
7. Das ConA-Sepharose Material wurde noch zweimal mit Puffer A gewaschen.
8. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-Page und Western Blot hinsichtlich ihres sKDR Gehaltes und ihrer Reinheit überprüft. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Assay. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Um das Säulenmaterial besser von dem Überstand trennen zu können, wurden die Falcon Röhrchen nach den Schritten 3 - 7 bei 1000 upm für 3 min in der Megafuge (Heraeus) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert.

2.2 Herstellung der verschiedenen Konjugate

2.2.1 Jodierung von VEGF

Gereinigtes rhVEGF₁₆₅ wurde mit Na¹²⁵J nach der Chloramin-T Methode (Hunter 1962) radioaktiv markiert.

Protokoll:

1. 5 µg rhVEGF₁₆₅ wurden in ein silanisiertes Glasgefäß mit Schraubdeckel gegeben und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 auf 100 µl aufgefüllt.
2. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 µl ¹²⁵Jod (2,5 µl ¹²⁵Jod entsprachen 250 Ci) und 20 µl Chloramin T (1 mg/ml in PBS, maximal 30 min alt).
3. Nach 60 bis 90 s Reaktionszeit wurde 20 µl Na-Metabisulfit (1 mg/ml in PBS, maximal 30 min alt) zugegeben.
4. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit PBS und 1 mg/ml BSA auf 2,5 l aufgefüllt.
5. Ungebundenes Jod wurde durch Filtration mit einer PD 10 Säule vom Konjugat getrennt. Dazu wurde der Ansatz auf eine mit PBS und 1 mg/ml BSA äquilibrierte Säule gegeben und mit PBS und 1 mg/ml BSA eluiert. Das erste Eluat von 2,5 ml wurde verworfen. Es wurden drei weitere Fraktionen à 1 ml und eine à 0,5 ml gesammelt.
6. Von jeder Fraktion wurden 5 µl im Gamma-Counter ausgezählt.
7. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden von jeder Fraktion, die weiter verwendet wurde, 2 µl entnommen und mit 20 µl Serum versetzt und erneut im Counter vermessen.
8. Anschließend wurden 1 ml einer 10 % igen TCA-Lösung zugegeben und 15 min inkubiert. Danach wurde 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Counter vermessen. Durch diese TCA-Fällung konnte die Einbaurate bestimmt werden.

2.2.2 Peroxidase-Konjugate

Für die Entwicklung eines kompetitiven Assayformates basierend auf den löslichen Rezeptorproteinen wurde ein VEGF-Peroxidase-Konjugat (VEGF-POD) benötigt. Für den Assay im Sandwichformat und die Messungen im FIA-System wurden verschiedene Anti-VEGF-Antikörper ebenfalls mit Peroxidase (POD) markiert. Die Herstellung der Konjugate erfolgte mit Hilfe der aktivierten Peroxidase von Pierce (Produktnr. 31487). Bei dieser Methode reagierten die aktivierten Oligosaccharidreste der Peroxidase mit den Aminofunktionen des Wachstumsfaktors bzw. des Antikörpers. Da es sich bei VEGF um ein disulfidverbrücktes Dimer handelt, das durch Reduktionsmittel in Monomere gespalten werden kann, wurde die Methode variiert und die VEGF-POD-Kopplung sowohl mit NaCNBH_3 und Ethanolamin (*Variante A*) als auch mit Lysin (*Variante B*) durchgeführt.

Protokoll:

1. 500 μl einer rmVEGF_{164} -Lösung (1 mg/ml) bzw. 1 ml der Anti-VEGF-Antikörper K6 (110 $\mu\text{g/ml}$) oder VG76e (1 mg/ml) wurden gegen 0,1 M PBS-Puffer pH 7,2 dialysiert. Die aktivierte Peroxidase bindet an Aminofunktionen. Daher war es notwendig den vorhandenen Tris-Puffer durch eine Dialyse zu entfernen.
2. 1 mg der aktivierten Peroxidase wurde in 100 μl deion. Wasser gelöst und im Molverhältnis von 4 : 1 zu der VEGF- bzw. Antikörperlösung gegeben.
3. *Variante A:* Zu diesem Reaktionsgemisch wurde sofort pro mg Peroxidase 10 μl 5 M NaCNBH_3 gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden noch 20 μl 3 M Ethanolamin pH 9 pro mg Peroxidase hinzugefügt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Durch Dialyse gegen PBS pH 7,2 wurde das Ethanolamin entfernt und der pH-Wert wieder in den neutralen Bereich gebracht.
Variante B: Das Peroxidase-Protein-Gemisch wurde für 1 h bei RT inkubiert. Die Absättigung der noch aktiven Peroxidase erfolgte durch die Zugabe von 2 Mol Lysin pro Mol Peroxidase. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert.

4. Die Konjugate wurden mit 10 mg/ml BSA stabilisiert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Biotinylierung von VEGF

rhVEGF₁₂₁ wurde mit Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert und im FIA-System verwendet.

Protokoll:

1. 500 µg des Wachstumsfaktors (1 mg/ml) wurde gegen 0,1 M PBS pH 7,2 dialysiert, um den Tris-Puffer aus der Aufreinigung zu entfernen.
2. Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde in deionisiertem Wasser gelöst (1 mg/ml).
3. VEGF und Sulfo-NHS-LC-Biotin wurden in einem Molverhältnis von 1 : 50 zusammengegeben und für 15 min bei RT inkubiert.
4. Überschüssiges Biotin wurde mittels Dialyse gegen 0,1 M PBS pH 7,2 entfernt.
5. Das Konjugat wurde mit 10 mg/ml BSA stabilisiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.3 Gelelektrophorese

Es wurde sowohl mit SDS-Mini-Gelen im PhastSystem von Amersham Pharmacia Biotech als auch mit selbst hergestellten Gelen und dem Laemmli Elektrophorese System im Mini-Protean II System von BioRad gearbeitet. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde der Reinheitsgrad aufgereinigter Proteine und die Zusammensetzung der Konjugate nach der Kopplung ermittelt. Die Gelelektrophorese war auch der erste Schritt für eine Proteinidentifizierung im Western Blot (Kap. II.2.4).

2.3.1 Gelelektrophorese mit dem PhastSystem

Protokoll:

1. 15 µl Probe wurden mit 5 µl reduzierendem oder nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt.
2. Während dessen wurden die PhastGele, Pufferstreifen und die benötigten Halterungen in der Anlage plaziert.
3. Die Proben und ein Molekulargewichtsstandard wurden vorsichtig auf einen Kamm mit der benötigten Taschenzahl aufgetragen und an die dafür vorgesehene Stelle gehängt.
4. Anschließend wurde das entsprechende Programm, abhängig von der Art und Zahl der Gele, gestartet.
5. Nach Ende des Trennprogramms wurden die Gele in die Färbekammer geklemmt und mit einer Silberlösung gefärbt. Die dazu benötigten Lösungen (Kap. III.1.8) wurden hergestellt, an den entsprechenden Schlauch angeschlossen und das Programm für die Silberfärbung gestartet (Tab. 2). Nach dem Färben wurden die Gele getrocknet und gelagert.

Tab. 2: Silberfärbung mit dem PhastSystem

Schritt	Lösung	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1 bzw. 3	Waschlösung 1	2 bzw. 4	50
2	Fixierlösung	6	50
4 bzw. 5	Waschlösung 1	3 bzw. 5	50
6 bzw. 7	Waschlösung 2	2	50
8	Färbelösung	6,5	40
9 bzw. 10	Waschlösung 2	0,5	30
11 bzw. 12	Entwickler	0,5 bzw. 2	30
13	Stopplösung	2	30
14	Schutzlösung	5	50

2.3.2 Gelelektrophorese mit dem Mini-Protean II System

Für die Arbeiten mit diesem System wurden zunächst die benötigten Gele hergestellt. Als Spannungsquelle für die anschließende Elektrophorese diente der Power Pack 25 von Biometra. Die Gele wurden entweder für Western Blots verwendet oder direkt mit dem 2D-Silver Stain II Daiichi Kit von Daiichi Pure Chemicals gefärbt.

Protokoll für die Gelelektrophorese:

1. Die Reagenzien für das Trenngel wurden gemischt, wobei die Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED) zum Schluß zugegeben wurden (Tab. 3). Das Gemisch wurde sofort in die Gelkammern gefüllt und mit Methanol überschichtet.
2. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Methanol entfernt, die Reagenzien für das Sammelgel zusammen gegeben und auf das Trenngel in die Gelkammer gefüllt (Tab. 3). Anschließend wurde vorsichtig der gewünschte Kamm (Anzahl und Größe der Taschen) in das flüssige Sammelgel gesteckt. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingebaut, die dann Laufpuffer gefüllt wurde.
3. Für reduzierende SDS-Gele wurden 15 µl der Proben mit 5 µl Probenpuffer 2 versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Für nicht reduzierte SDS-Gele wurden 15 µl der Proben mit 5 µl Probenpuffer 1 versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf die Gele aufgetragen.
4. Die Gele liefen bei 100 V, bis die blaue Farbe des Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte. Danach liefen die Gele bei 200 V bis die blaue Farbe aus den Gelen gelaufen war. Insgesamt dauerte die Elektrophorese ca. 30 min.
5. Anschließend wurde die Gele mit einer Silberösung gefärbt oder für einen Western Blot verwendet (Kap. III.2.4).

Tab. 3: Zusammensetzung der Gele

	Trenngel 15%	Trenngel 10 %	Sammelgel
30 % Acryl-/Bisacrylamid	3,75 ml	5,6 ml	0,9 ml
1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	-
0,8 M Tris-HCl, 0,4 % SDS pH 6,8	-	-	1,75 ml
Wasser	4,68 ml	2,8 ml	4,27
10 % APS	75 µl	75 µl	35 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

Silberfärbung mit 2D-Silver Stain II Daiichi Kit:

Der Kit bestand aus 6 Fertiglösungen, aus denen durch Mischen mit bzw. Zugabe von Essigsäure, Methanol oder deionisiertem Wasser die benötigten Reagenzien hergestellt wurden (Kap. III.1.8). Die Gele wurden in den verschiedenen Lösungen nacheinander bei Raumtemperatur inkubiert:

1. Fixierlösung I 10 min
2. Fixierlösung II 15 min
3. Waschen mit Wasser 2 min
4. Pre-treatment-Lösung 10 min
5. Waschen mit Wasser 5 min
6. Färbelösung 15 min
7. Waschen mit Wasser 3 x 2 min
8. Entwickler 5 - 10 min
9. Zugabe der Stopplösung

Die gefärbten Gele wurden anschließend getrocknet.

2.4 Western Blot

Mit Hilfe dieser Technik und ihrer spezifischen Antikörper wurden verschiedene Proteine identifiziert. Zunächst wurden die zu untersuchenden Proben z.B. aus einer Aufreinigung sowie ein Proteingrößenstandard auf die Gele aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese (Kap. III. 2.3.2), wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und durch Inkubation mit einem spezifischen und einem sekundären mit Alkalische Phosphatase (AP) markierten Antikörper nachgewiesen. Die für die verschiedenen Proteine verwendeten Antikörper-Kombinationen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Protokoll:

1. Die Immobilon P Membran wurde auf die Größe der Gele geschnitten, kurz mit Methanol benetzt, mit dest. Wasser gewaschen und dann zusammen mit dem Gelen für ca. 20 min in den Transferpuffer gelegt. Sechs Whatman Filterpapierstücke in Gelgröße wurden ebenfalls kurz in den Transferpuffer gelegt.
2. Anschließend wurden die Gele, die Membran und Filterpapierstücke nach dem folgenden Aufbau auf die Fläche des BioRad SD Systems gelegt:

Kathode(-)

3 Whatman Filterpapierstücke

Gel

Immobilon P Membran

3 Whatman Filterpapierstücke

Anode(+)

Es wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befanden und alle Schichten gleichmäßig feucht waren.

3. Die Proteine wurden bei 15 V (bei zwei Gelen) für 20 min auf die Membran geblottet.
4. Die Membran wurde für ein bis zwei Minuten in Ponceau S gelegt, um die geblotteten Proteine rot anzufärben. Die zunächst vollständig rot gefärbte Mem-

- bran wurde solange gewaschen, bis die einzelnen Proteine zu erkennen waren. Die Proteine des Größenstandards wurden mit einem Stift markiert.
5. Anschließend wurde die Membran blockiert. Dazu wurde sie 30 min bei 37 °C oder 1 h bei RT in 1 : 5 verdünnter Milch in TBS inkubiert.
 6. Der primäre Antikörper wurde in Assaypuffer (TBS, 10 % Milch) verdünnt, auf die Membran gegeben und 1 h bei RT inkubiert.
 7. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit TBST gewaschen.
 8. Der sekundäre Antikörper wurde in Assaypuffer (TBS, 10 % Milch) verdünnt, auf die Membran gegeben und 1 h bei RT inkubiert.
 9. Nachdem die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen wurde, wurde sie kurz mit dest. Wasser gewaschen und vorsichtig mit einem Papiertuch trocken getupft.
 10. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 5 - 10 ml Western Blue Stabilized Substrate. Nach 5 - 10 min wurde die Farbreaktion durch Abgießen der Färbelösung und Waschen mit Wasser gestoppt.

Tab. 4: Verwendete Antikörper Kombinationen

Protein	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
VEGF	K7 (Kaninchen Anti-VEGF), 1 : 500	Anti-Kaninchen-AP, 1 : 10000
sFLT-1	FLT-11 (Maus Anti-FLT-1), 1 : 1000	Anti-Maus-AP, 1 : 7500
sKDR	R212 (Kaninchen Anti-sKDR), 1 : 1000	Anti-Kaninchen-AP, 1 : 10000

2.5 BCA(Bicinchoninic Acid)-Assay

Eine Möglichkeit, die Gesamtproteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, war der BCA-Assay (Pierce). Dieser Assay setzte sich aus einer Lösung A, die Bicinchonische-säure (BCA), und einer Lösung B (4 % CuSO_4), die zweiwertige Kupferionen enthielt, zusammen. Durch Mischen der beiden Lösungen und Zugabe einer proteinhaltigen Probe kam es bei 60 °C zu den folgenden Reaktionen:

1. Protein (Peptidbindung) + Cu^{2+} → vierzähliger Cu^+ -Komplex
2. $\text{Cu}^+ + 2 \text{BCA} \rightarrow \text{BCA-Cu}^+$ -Komplex

Durch die Bildung des BCA-Cu^+ -Komplexes änderte sich die Farbe der Probe von grün (CuSO_4) zu violett. Die Farbintensität bzw. gebildete Komplexmenge war proportional zur Proteinmenge in der Probe.

Protokoll:

1. Reagenz A und Reagenz B wurden im Verhältnis 50 : 1 gemischt.
2. Zu je 950 µl des Gemisches wurden 50 µl Probe bzw. 50 µl einer BSA Standardreihe (0 - 200 µg/ml) gegeben, gut durchmischt und bei 60 °C für 30 min inkubiert.
3. Das Reaktionsgemisch wurde in Küvetten pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.
4. Die optischen Signale und die Konzentrationen der BSA-Standardreihe wurden gegeneinander aufgetragen. Mit Hilfe der erhaltenen Kalibrierkurve wurde die Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt.

2.6 Verschiedene Assayformate in der Mikrotiterplatte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Mikrotiterplattenassays auf Basis der löslichen VEGF-Rezeptoren sFLT-1 und sKDR entwickelt. Alle Assayschritte mit Ausnahme der Beschichtung wurden bei RT durchgeführt. Die in den nachfolgenden Protokollen angegebenen Volumina in μl gelten pro Kavität. Um Verdünnungseffekte in den Kavitäten zu vermeiden, wurden die Platten nach den Waschschritten auf Papier ausgeklopft. Alle Meßwerte wurden mindestens doppelt bestimmt.

2.6.1 Radioaktiver VEGF-Assay

Dieser Assay mit ^{125}J -rhVEGF₁₆₅ wurde für verschiedene Untersuchungen benutzt und nach Bedarf in Schritt 2 modifiziert. Für die Bindungsstudien und die Bestimmung der K_D -Werte wurden Sättigungskurven mit dem jodierten Wachstumsfaktor aufgenommen (*Variante A*). Für alle anderen Untersuchungen wurde der Assay in ein kompetitives Format umgewandelt. Dabei konkurrierten verschiedene Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins bzw. Peptids mit 1 ng/ml des radioaktiv-markierten Wachstumsfaktors (*Variante B*). Bei einigen Experimenten wurde der Kompetitor vorinkubiert (*Variante C*).

Protokoll:

1. Beschichten der Platte

Die Beschichtung der MaxiSorp-Platten erfolgte mit 0,5 bis 2 $\mu\text{g/ml}^1$ sFLT-1 oder sKDR. Dazu wurden die löslichen Rezeptorproteine in PBS pH 7,2 entsprechend verdünnt, mit einer äquivalenten Menge Heparin (Stock 1 mg/ml) versetzt und 50 oder 100 μl pro Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten geleert, die Platte mit 200 μl Blockpuffer für 1 h bei

¹In Tabelle 5 sind die genaue Beschichtungen für die einzelnen Experimente angegeben.

RT abgesättigt und dreimal mit Bindepuffer gewaschen.

2. Zugabe der Proben

Variante A: In Bindepuffer wurde eine Verdünnungsreihe von 1 - 200 ng/ml (sFLT-1 Beschichtung) bzw. von 1 - 1000 ng/ml (sKDR Beschichtung) ^{125}J -VEGF hergestellt. Um den unspezifischen Anteil der Bindung von ^{125}J -VEGF erfassen zu können, wurde die Verdünnungsreihe mit und ohne einen 50 fachen Überschuß unmarkierten VEGFs vermessen. 100 µl jeder Konzentration wurden für 1,5 h bei RT auf der Platte inkubiert.

Variante B: Verschiedene Konzentrationen der Proben wurden für 1,5 h bei RT zusammen mit ^{125}J -rhVEGF₁₆₅ (1 ng/ml Endkonzentration) inkubiert. Probe und markiertes VEGF ergaben ein Gesamtvolumen von 100 µl pro Kavität.

Variante C: Wie Variante B, nur wurde hier die Probe 15 min vorinkubiert, dann erst ^{125}J -rhVEGF₁₆₅ (1 ng/ml Endkonzentration) zugegeben und anschließend das Gemisch für 1,5 h bei RT inkubiert.

3. Lösen des Rezeptor-Ligand-Komplexes von der Platte

Nachdem die Platte zweimal mit Bindepuffer und zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen wurde, wurden 100 µl Lysepuffer pro Kavität zugegeben. Nach 5 bis 10 min bei RT waren die Komplexe von der Oberfläche gelöst.

4. Bestimmen der gebundenen ^{125}J -VEGF-Menge

Der Lysepuffer mit den gelösten Komplexen wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und im Gamma-Counter (Wallac, Finnland) vermessen.

Tab. 5: Beschichtung der Platte bei den radioaktiven Experimenten

Beschichtung	Kompetitor	Endkonzentrationen der Bindungspartner	Kapitel und Abbildung
Bindungsstudien, <i>Variante A</i> :			
1 µg/ml sFLT-1, 100 µl/Kavität	-	1-200 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$	IV.2.1.1 Abb. 23
2 µg/ml sKDR, 100 µl/Kavität	-	1- 1000 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$	IV.2.1.1 Abb. 25
Kompetitive Experimente, <i>Variante B</i> :			
1 µg/ml sFLT-1, 100 µl/Kavität	VEGF ₁₆₅ , (B.) VEGF ₁₂₁ , (E.c.) PlGF 2, (B.)	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ 25, 50 ,100, 200 ng/ml Kompetitor	IV.2.2 Abb. 27
2 µg/ml sKDR, 100 µl/Kavität	VEGF ₁₆₅ , (B.) VEGF ₁₂₁ , (E.c.) PlGF 2 (B.)	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ 25, 50 ,100, 200 ng/ml Kompetitor	IV.2.2 Abb. 28
0,5 µg/ml sFLT-1 50 µl/Kavität	VEGF ₁₆₅ (B.), VEGF ₁₆₅ (E.c.) VEGF ₁₆₄ (B.) VEGF ₁₂₁ (E.c.) VEGF ₁₂₁ (E.c.)	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ 5, 10 , 50, 100, 200 ng/ml Kompetitor	IV.2.3.1 Abb. 29
0,5 µg/ml sFLT-1 50 µl/Kavität	VEGF ₁₆₅ (B.) sFLT-1 (7.8.98) sFLT-1 (4.8.98) sFLT-1 (7.97)	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ 5, 10 , 50, 100, 250 ng/ml Kompetitor	IV.2.3.1 Abb. 30
0,5 µg/ml sFLT-1 50 µl/Kavität	Exon 6 Peptid Exon 7 Peptid	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 µg/ml Kompetitor	IV.2.3.1 Abb. 31
0,5 µg/ml sFLT-1 50 µl/Kavität	K7 Serum	1 ng/ml $^{125}\text{J-VEGF}_{165} +$ Serum 1/10, 1/25, 1/50, 1/ 100 verdünnt	IV.2.3.2 Tab. 12
Kompetitive Experimente, <i>Variante C</i> :			
2 µg/ml sKDR, 100 µl/Kavität	Anti-KDR 212 Immun- und Präimmunserum	Präimmunserum 1/50, Immunserum 1/50, 1/100	IV.2.3.2 Abb. 33, Tab. 11

2.6.2 Relida I - Sandwichformat

Dieser Assay im Sandwichformat wurde sowohl für den Nachweis von humanen als auch von murinen VEGF entwickelt. Zur Optimierung wurden Konzentration und Volumen bei der Beschichtung variiert, unterschiedliche Pufferzusammensetzungen getestet, die benötigten Antikörperkonzentrationen durch zweidimensionale Titration bestimmt und durch Vergleichsmessungen die Antikörper mit der größten Sensitivität ermittelt. Getestet wurden verschiedene Anti-VEGF-Antikörper in Kombination mit einem sekundären mit Peroxidase markierten Antikörper. Um das Protokoll zu verkürzen, wurden einige Anti-VEGF-Antikörper mit Peroxidase gekoppelt und ebenfalls getestet (Kap. III.2.2.2) Bei dem angegebenen Protokoll handelt es sich um das optimierte Standardprotokoll.

Standardprotokoll:

1. Beschichten der Platte

Die Beschichtung der MaxiSorp-Platten erfolgte mit 1 µg/ml sFLT und 1 µg/ml Heparin oder 2 µg/ml sKDR und 2 µg/ml Heparin. Die löslichen Rezeptorproteine wurden in PBS pH 7,2 entsprechend verdünnt, eine äquivalente Menge Heparin (Stock 1 mg/ml) zugegeben und 100 µl pro Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten geleert, die Platte mit 200 µl Blockpuffer für 1 h bei RT abgesättigt und dreimal mit PBST gewaschen.

2. Zugabe der Probe bzw. des Standards

Als Standard wurde rhVEGF₁₆₅ bzw. rmVEGF₁₆₄ verwendet. Die Standardreihe mit 0 bis 200 ng/ml VEGF wurde in PBST hergestellt. Die Proben wurden ebenfalls in PBST verdünnt. Pro Kavität wurden 100 µl Probe oder Standard für 2 h bei RT inkubiert.

3. Immunreaktion mit dem primären Antikörper

Je nach Standard wurde ein Anti-hVEGF- oder der Anti-mVEGF-Antikörper in PBST verdünnt (Tab. 6). 100 µl Antikörperlösung wurden pro Kavität für 1 h bei

RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBST gewaschen.

4. Zugabe des sekundären Antikörpers

Der sekundäre Antikörper wurde passend zum primären Antikörper gewählt (siehe Tab. 6) und entsprechend verdünnt. 100 µl wurden in jede Kavität pipettiert und für 1 h bei RT auf der Platte inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBST. Wurde mit einem Peroxidase markiertem Anti-VEGF-Antikörper gearbeitet, so entfiel dieser Schritt.

5. Farbreaktion

100 µl TMB-Substratlösung pro Kavität wurden auf die Platte pipettiert. Nach 5 - 10 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption am ELISA-Reader bei 450 - 650 nm vermessen.

Tab. 6: Verwendete Antikörper

Standard	1. Antikörper		2. Antikörper	
rhVEGF ₁₆₅	Anti-hVEGF (Klon 26503.11)	1 : 1000	Anti-Maus-POD	1 : 1500
	Anti-hVEGF (Klon 14-124)	1 : 100	Anti-Maus-POD	1 : 1500
	VG 76e	1 : 1000	Anti-Maus-POD	1 : 1500
	K3	bis 20 µg/ml	Anti-Kaninchen-POD	1 : 10000
	K6	bis 20 µg/ml	Anti-Kaninchen-POD	1 : 10000
	K6-POD	bis 20 µg/ml	-	
rmVEGF ₁₆₄	VG76e-POD	1 : 500	-	
	Anti-mVEGF	1 : 400	Anti-Ziege-POD	1 : 20000

2.6.3 Relida II - Kompetitives Format mit VEGF-POD

Protokoll:

1. Beschichten der Platte

Die Beschichtung der MaxiSorp-Platten erfolgte mit 1 µg/ml sFLT und Heparin oder 2 µg/ml sKDR und Heparin. Die löslichen Rezeptorproteine wurden in PBS pH 7,2 entsprechend verdünnt, eine äquivalente Menge Heparin (Stock 1 mg/ml) zugegeben und 100 µl pro Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten geleert, die Platte mit 200 µl Blockpuffer für 1 h bei RT abgesättigt und dreimal mit PBST gewaschen.

2. Konkurrenz

1 µg/ml VEGF-POD wurde mit 0 bis 2 µg/ml rhVEGF₁₆₅ kombiniert. Bei den angegebenen Konzentrationen handelte es sich um die Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch. Pro Kavität wurden 100 µl des Gemisches für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBST gewaschen.

3. Farbentwicklung

100 µl TMB-Substratlösung pro Kavität wurden auf die Platte pipettiert. Nach 10 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption am ELISA-Reader bei 450 - 650 nm vermessen.

2.6.4 Relida III - Sandwichformat mit Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD

Um die Sensitivität des Assays zu verbessern, wurden Anti-hVEGF und Anti-Maus-POD gegen Anti-hVEGF-Biotin und ein Polyperoxidase-Streptavidin-Konjugat (SA-POD) ausgetauscht. Die Detektion erfolgte kolorimetrisch mit dem TMB/H₂O₂ System (*Variante A*) und durch Chemilumineszenz (*Variante B*). Bei *Variante A* wurden MaxiSorp-Platten und für *Variante B* schwarzen FluoroNunc-Platten verwendet. Beide Platten besaßen die gleiche Oberfläche.

Protokoll:

1. Beschichten der Platten

Die Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/ml sFLT und Heparin (100 µl/Kavität) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Kavitäten geleert, die Platte mit 200 µl Blockpuffer pro Kavität für 1 h bei RT abgesättigt und dreimal mit PBST gewaschen.

2. Zugabe der Probe bzw. des Standards

Als Standard wurden rhVEGF₁₆₅-Konzentrationen von 0 bis 200 ng/ml verwendet. 100 µl Standard pro Kavität wurden für 2 h bei RT auf der Platte inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBST gewaschen.

3. Immunreaktion

Das Anti-hVEGF-Biotin Konjugat wurde 1 : 500 in HPE-Puffer verdünnt, 100 µl in jede Kavität pipettiert und für 1,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBST gewaschen.

4. Zugabe von SA-POD

SA-POD wurde in HPE-Puffer 1 : 10000 verdünnt und 100 µl in jede Kavität pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde die Platte sechsmal mit PBST gewaschen.

5. Nachweis

Variante A: 100 µl TMB-Substratlösung pro Kavität wurden auf die Platte pipettiert. Nach 10 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption am ELISA-Reader bei 450 - 650 nm vermessen.

Variante B: Während der Inkubation von SA-POD wurden die Komponenten A und B des Chemilumineszenz-Substrates (Boehringer, Mannheim) im Verhältnis 100 : 1 gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Platte (Schritt 4) wurden je 100 µl des Chemilumineszenz-Substrates pro Kavität zupipettiert. Nach 3 min wurde die Platte am Berthold Luminometer bei 1 s und 5 s vermessen.

2.6.5. Quantikine Human VEGF Immunoassay von R&D Systems

Im Rahmen von Vergleichsmessungen wurden einige Proben mit dem Quantikine Human VEGF Immunoassay von R&D Systems (Wiesbaden) bestimmt. Der Assay wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.7 BIAcore-System

Mit diesem System wurden kinetische Untersuchungen und quantitative Bestimmungen des Wachstumsfaktors durchgeführt, die jeweils andere Versuchsbedingungen erforderten. Beschichtungsdichte, Fließrate, Probenvolumen und Regeneration wurden dementsprechend optimiert. Alle Messungen erfolgten auf CM5-Sensorchips (Kap. II.4.1.2) bei 25 °C und mit 10 mM HBS pH 7,4 als Assaypuffer. Nach dem Einbau des Sensorchips wurde das System für 6 min mit einer Fließrate von 100 - 1000 µl/min gespült (Working tool: *Prime*). Anschließend wurden die löslichen Rezeptoren über ihre Aminofunktionen mit Hilfe von N-Ethyl-N-(dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) an die carboxylierte Dextranmatrix der CM5-Sensorchips gekoppelt. Für die Immobilisierung lag der pH-Wert des Kopplungspuffers unter pH 6 und unter dem pI-Wert des zu koppelnden Proteins, da sonst Oberfläche und Protein negativ geladen gewesen wären und sich gegenseitig abgestoßen hätten. Für die Kopplung wurde immer 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 verwendet. In allen Messungen diente 10 mM HBS pH 7,4 als Assaypuffer. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden entgast und filtriert.

Die Wahl der Fließzellen (einzeln oder in Reihe), der Temperatur, der Fließrate, des Probenvolumens und anderer Lösungen sowie das Mischen von Lösungen wurden mit der BIAcore-Control-Software gesteuert.

2.7.1 Kinetische Untersuchungen

Für kinetische Untersuchungen wurden alle vier Fließzellen auf der Sensoroberfläche gleichzeitig genutzt. Auf ihnen wurden verschiedene möglichst geringe Rezeptormengen immobilisiert, um das Problem des Massentransportes zu minimieren. Puffer, Lösungen und verschiedene rhVEGF₁₆₅-Konzentrationen wurden über den ganzen Chip, d.h. nacheinander über alle Zellen geleitet. Die erste Fließzelle diente immer als Referenzzelle, d.h. die Oberfläche wurde zusammen mit den anderen aktiviert und deaktiviert, aber kein Rezeptorprotein immobilisiert.

Immobilisierung:

1. Zunächst wurde der Assaypuffer mit einer Fließrate von 5 µl/min über den Sensor geleitet. Die Fließrate wurde während der ganzen Immobilisierung beibehalten.
2. Für die Aktivierung der Oberfläche wurden je 50 µl 200 mM EDC und 50 mM NHS gemischt und 35 µl des Gemisches injiziert (5 µl/min, 7 min).
3. Durch Zugabe von 35 µl Ethanolamin (5 µl/min, 7 min) erfolgte die Absättigung der Oberfläche.
4. Die Oberfläche wurde erneut, wie in Schritt 1 beschrieben, aktiviert.
5. 1 µg der löslichen Rezeptorproteine wurden in 100 µl 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 gelöst und mit einer Fließrate von 5 µl/min durch die gewünschte Fließzelle geleitet, bis die angestrebte Rezeptormenge gekoppelt war. Im Rahmen der kinetischen Untersuchungen wurden 108 RU in Fließzelle 2, 194 RU in Fließzelle 3 und 340 RU in Fließzelle 4 immobilisiert.
6. Anschließend wurde die Sensoroberfläche mit Ethanolamin abgesättigt (siehe Schritt 2)
7. Durch einen kurzen Puls mit 5 mM NaOH (5 µl, 30 µl/min, 10 s) wurden nicht kovalent gebundene Proteinreste von der Oberfläche entfernt.

Messung:

1. Die Fließrate wurde auf 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ erhöht und während der ganzen Messung nicht verändert. Zunächst wurde der Assaypuffer über den Sensor geleitet.
2. Anschließend wurden 5 μl 10 mM HCl (10 s) injiziert, um zu prüfen, ob sich noch Rückstände von der Kopplung auf der Oberfläche befanden bzw. die Oberfläche vollständig regeneriert war.
3. Nach dem Wiedererreichen der Basislinie erfolgte die Injektion von 120 μl einer VEGF-Lösung bzw. des Assaypuffers (Nullwert). 120 μl Injektionsvolumen entsprachen einer Inkubationsdauer von 4 min.
4. Um die Dissoziationsphase erfassen zu können, wurde 30 min mit dem Assaypuffer gespült und der Zerfall des Komplexes aufgenommen.
5. Durch die aufeinanderfolgende Zugabe von je 5 μl 10 mM HCl und 5 mM NaOH wurde das noch gebundene VEGF entfernt. Anschließend wurde noch 10 min mit Puffer gespült, um wieder eine stabile Grundlinie zu erhalten.
6. Durch Wiederholen der Schritte 3 bis 5 wurden nacheinander das Bindungsverhalten von 1, 2, 5, 10 und 20 nM VEGF beobachtet.

Anschließend wurde mit der BIAevaluation-Software von BIAcore die Assoziations-, Dissoziations- und die Affinitätskonstante bestimmt.

2.7.2 Quantitative Analytik

Für diese Messungen wurden zwei Fließzellen verwendet. In einer wurde der Rezeptor immobilisiert und die andere diente als Referenzzelle. Im Vergleich zu den kinetischen Messungen wurde hier mit einer wesentlich höheren Rezeptordichte auf der Sensoroberfläche gearbeitet. Untersucht wurden u.a. der Einfluß der immobilisierten Rezeptormengen und des injizierten Probenvolumens auf die Assaysensitivität.

Immobilisierung:

1. Mit einer Fließrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde der Assaypuffer (HBS-Puffer) über die Sensoroberfläche geleitet.
2. Für die Aktivierung der Oberfläche wurden je 50 μl 200 mM EDC und 50 mM NHS gemischt und 35 μl des Gemisches injiziert (5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 7 min).
3. 1 μg der löslichen Rezeptorproteine wurden in 100 μl 0,1 M Acetatpuffer pH 5,5 gelöst und mit einer Fließrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch die gewünschte Fließzelle geleitet bis die angestrebte Rezeptormenge gekoppelt war. Für die verschiedenen Untersuchungen wurden zwischen 1830 und 5000 RU immobilisiert.
4. Durch Zugabe von 35 μl Ethanolamin (5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 7 min) erfolgte die Absättigung der Oberfläche.
5. Durch einen kurzen Puls mit 5 mM NaOH (5 μl , 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 10 s) wurden nicht kovalent gebundene Proteinreste von der Oberfläche entfernt.

Messung:

1. Es wurde eine Fließrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt und der Assaypuffer über die Oberfläche geleitet.
2. Nach Erhalt der Basislinie erfolgte die Injektion von 5 bzw. 20 μl (1 bzw. 4 min) des VEGF-Standards bzw. der Probe oder des Assaypuffers. Die VEGF-Standardreihe reichte von 122 pM bis 125 nM und wurde in HBS-Puffer hergestellt. Die Proben wurden ebenfalls in Assaypuffer verdünnt.
3. 5 min nach Ende der Probenzugabe wurde mit der Regeneration der Oberfläche begonnen. Dazu wurde die Fließrate auf 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ erhöht und der Sensor nacheinander mit 1 M NaCl (30 μl , 1 min), 10 mM HCl (10 μl , 10 s) und zweimal mit 5 mM NaOH (10 μl , 20 s) gespült. Anschließend wurde die Fließrate wieder auf 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ geändert und noch weitere 20 min mit Puffer gespült.
4. Durch Wiederholen der Schritte 1 bis 3 wurden nacheinander die Standardreihe und die Proben vermessen. Alle Werte wurden doppelt bestimmt.

Ausgewertet wurde die Differenz zwischen der Signalhöhe der Basislinie und der Signalhöhe kurz nach Ende der Probenzugabe. Um die Stabilität der Oberfläche, d.h den Aktivitätsverlust der Rezeptoren, zu erfassen, wurden statt einer Verdünnungsreihe immer wieder eine konstante Menge-VEGF (25 oder 10 nM) über den Sensor geleitet und die Abnahme der anlagerbaren VEGF-Menge beobachtet. Die vermessenen Zellkulturüberstände mußten vorher mit Hilfe einer Spritze und des Minisart Filters von Sartorius filtriert werden, um Zellreste abzutrennen und ein Verstopfen des Mikrofließsystems zu verhindern.

2.8 Fließinjektionsanalyse (FIA)

Um eine Nachweismethode für rhVEGF₁₆₅ mit Hilfe des FIA-Systems aufbauen zu können, wurden neben einem Peroxidase markiertem Anti-VEGF-Antikörper und einem VEGF-Biotin-Konjugat (Kap. II.2.2.2 und 2.2.3), auch ein Affinitätsreaktor mit biotinyliertem Trägermaterial benötigt. Als Trägermaterial dienten Glaskugeln von Sigma mit einem Durchmesser von 150 - 212 µm und einer Schüttdichte von 1,5 g/ml. Die Glas-Beads wurden zunächst silanisiert und dann biotinyliert.

2.8.1 Silanisierung und Aktivierung des Glasträgers

Silanisierung der Glas-Beads (Stiene 1997):

1. Die Reinigung der Glaskugeln erfolgte in heißer 50 % iger Schwefelsäure für eine Stunde bei 100 °C.
2. Anschließend wurde das Trägermaterial mit dest. Wasser gewaschen, bis es säurefrei waren. Die Kontrolle erfolgte über den pH-Wert des Waschwassers.
3. Nach der Überführung der Beads in einen Rundkolben wurde eine 10 %ige 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan(GOPS)-Lösung (in 0,1 M KPi pH 7) zugegeben.

Das Volumenverhältnis von Beads und Lösung betrug 1 : 2.

4. Die Silanisierung des Glasträgers erfolgte über Nacht bei 100 °C unter Rückfluß und langsamen Rühren.
5. Nachdem die verbliebene GOPS-Lösung durch Waschen mit dest. Wasser entfernt worden war, wurde der Oxiranring durch einstündiges Kochen in 80 %iger Essigsäure zum Diol hydrolysiert (Kap. II.5).
6. Zum Schluß wurden die Glaskugeln erneut mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet (1 h bei 80 °C).

Die Diolform der silanisierten Oberfläche war äußerst stabil und konnte daher monatelang gelagert werden.

Aktivierung des Diols und Kopplung von Biocytin-Hydrazid (Stiene 1997):

1. 17 mg Natrium-meta-Perjodat wurden in 4 ml 80 % iger Essigsäure gelöst und mit 2 ml der silanisierten Beads für 90 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert, um das Diol zu einem Aldehyd zu oxidieren (Kap. II.5).
2. Durch Waschen mit 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 wurde das Oxidationsreagenz entfernt.
3. Die wie beschrieben aktivierten Glas-Beads wurden mit 2 ml Biocytin-Hydrazid-Lösung (2 mg/ml in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6) versetzt und 12 h bei RT inkubiert.
4. Durch Zugabe von 1,5 mg Natriumborhydrid in 3 ml Natriumcarbonatpuffer wurden die verbliebenen aktiven Aldehydgruppen und die Schiffschen Basen (Kap. II.5) reduziert und somit inaktiviert bzw. stabilisiert.
5. Das biotinylierte Trägermaterial wurde in dest. Wasser mit 0,05 % Azid bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurde es in kleine Affinitätsreaktoren mit einem Volumen von ca. 150 µl gefüllt und in das Fließsystem eingebaut.

2.8.2 Test der benötigten Konjugate

Mit einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte wurden VEGF-Biotin und K6-POD bzw. VG76e-POD getestet und die benötigten Konjugatkonzentration abgeschätzt.

Protokoll:

1. Beschichten der Platte

Die Beschichtung der MaxiSorp-Platten erfolgte mit 2 µg/ml Streptavidin. Dazu wurde das Protein in 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,6 gelöst und 100 µl pro Kavität über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten geleert, die Platte mit 200 µl Blockpuffer für 1 h bei RT abgesättigt und dreimal mit PBST gewaschen.

2. Zugabe des Biotin-Konjugates

Es wurde eine VEGF-Biotin-Verdünnungsreihe von 0 bis 4 µg/ml Konjugat in PBST hergestellt und 100 µl pro Kavität für 1 h bei RT auf der Platte inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBST gewaschen.

3. Immunreaktion mit den Peroxidase markierten Anti-VEGF-Antikörpern

VG76e-POD und K6-POD wurden von 1 : 500 bis 1 : 4000 in PBST verdünnt. Pro Kavität wurden 100 µl einer Antikörperlösung für 1 h bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBST.

4. Farbreaktion

100 µl TMB-Substratlösung pro Kavität wurden auf die Platte pipettiert. Nach 5 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption am ELISA-Reader bei 450 - 650 nm vermessen.

2.9.3 Vorbereitung und Ablauf der Messung

Zunächst wurden alle benötigten Puffer und Lösungen hergestellt und entgast. Der Reaktor mit dem biotinylierten Trägermaterial wurde in das FIA-System eingebaut und mit PBST gespült.

Messprotokoll:

1. Zuerst wurde die Immunreaktion gestartet. Dazu wurde VEGF-Biotin 1 : 100 und K6-POD 1 : 500 in PBST verdünnt sowie eine Verdünnungsreihe von 1 bis 20 $\mu\text{g/ml}$ rhVEGF₁₆₅ in PBST angesetzt. Anschließend wurden 500 μl der VEGF-Biotin-Lösung, 250 μl der Antikörperlösung und 250 μl Puffer bzw. VEGF-Standard in einem Eppendorfgeläß zusammen gegeben und 1 h bei RT in einem Inkubator mit 7 U/min inkubiert.
2. Anschließend wurden die Gefäße mit dem Reaktionsgemisch in den Autosampler der FIA gestellt und die Messung gestartet. Während im Affinitätsreaktor die Schritte 3 bis 5 durchgeführt wurden, wurde über den Bypass und den Detektor dest. Wasser geleitet.
3. Zunächst wurde für eine Minute die Streptavidin-Lösung mit einer Fließrate von 0,3 ml/min über den Reaktor geleitet. Anschließend wurde der Reaktor mit einer Fließrate von 0,6 ml/min 30 s mit PBST gespült.
4. Es folgte die Inkubation des Reaktionsgemisches. Dazu wurde das Gemisch mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min zum Reaktor transportiert. Dann wurde die Fließgeschwindigkeit auf 0,3 ml/min herabgesetzt und die Reaktanden wurden über den Reaktor geleitet. Alle 5 s wurde die Pumpe für 5 s angehalten, um die Inkubationsdauer der Bindungspartner auf der Reaktoroberfläche zu erhöhen. Insgesamt dauerte die Inkubation 2 min.
5. Anschließend wurde der Reaktor 2 min bei einer Fließrate von 0,3 ml/min mit PBST gespült.
6. Statt Wasser wurde nun die Substratlösung über die Elektrode gepumpt, um eine

stabile Basislinie zu erhalten (Kap. II.5). Die Peroxidase-Substratlösung bestand zu gleichen Teilen aus 2 mM p-Hydrochinon (Carrier B) und 2 mM H₂O₂ (Carrier A). Aus Stabilitätsgründen wurden die beiden Lösungen getrennt an das System angeschlossen und erst kurz vor Gebrauch durch ein Mischstück zusammen geführt. Durch Umschalten der Ventile wurde diese Lösung für 3 min erst über den Reaktor mit gebundenen VEGF-Biotin-K6-POD-Komplex und dann über die Elektrode geleitet. Der Transport der Kombination aus Carrier A und B bis zum Reaktor dauerte 1,5 min.

7. Anschließend wurde die Reaktoroberfläche durch zweimaliges Spülen mit 6 M Guanidin pH 0,2 regeneriert. Die Regeneration wurde bei einer Fließrate von 0,6 ml/min durchgeführt und dauerte jeweils 1,5 min. Anschließend wurde nochmal für 2 min mit PBST gespült.

2.9 Ergänzende Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit fanden Vergleichsmessungen zwischen Rezeptor- und Zellaassays statt. Die Messungen mit den Zellaassays wurden in Zusammenarbeit mit H. Weich (GBF, Braunschweig), wie unter 2.10.1 beschrieben, vorbereitet und durchgeführt. In Kooperation mit J. v. d. Heuvel und K. Eckert (beide GBF, Braunschweig) wurde die rhVEGF₁₆₅-Produktion bei Kultivierungen des *Pichia*-MUT^S-Stamm überwacht und der Einfluß bestimmter Parameter auf die VEGF-Produktion untersucht (Kap. III.2.10.2). Die verschiedenen Fermentationen wurden von J. v. d. Heuvel und K. Eckert durchgeführt.

2.9.1 Zellassay

Einige Bindungs- und Konkurrenzexperimente wurden mit humanen mikrovasculären Endothelzellen durchgeführt (Kap. IV.2.2 und 2.3). Die Zellen wurden in EGM Medium mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) in einem humiden Inkubator mit 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Kavität auf die Zellkulturplatten von Greiner mit 12- oder 24-Kavitäten gegeben. Nach 3 bis 4 Tagen waren die Zellen zu 70 - 90 % konfluent und konnten für die Vergleichsmessungen verwendet werden. Die Experimente im Rezeptor- und Zellassay erfolgten parallel. Die Durchführung des Zellassays entsprach dem Protokoll für den Rezeptorassay ab Schritt 2 (Kap. III.2.6.1). Der Unterschied bestand darin, daß von der Probe im Rezeptorassay 100 µl/Kavität und im Zellassay 1 ml/Kavität eingesetzt wurde. Alle anderen Bedingungen waren identisch.

2.9.2 Fermentation von rhVEGF₁₆₅ mit einem *Pichia*-MUT^S-Stamm

In Zusammenarbeit mit J. v .d. Heuvel und K. Eckert wurde die Bestimmung von rhVEGF₁₆₅ während der Kultivierung von *Pichia pastoris* durchgeführt. Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Hochzelldichtefermentation von *Pichia pastoris* und somit die VEGF-Produktion zu optimieren. Mit den entwickelten Rezeptorassays und einem kommerziellen Immunoassay wurde die VEGF-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation kontrolliert (Kap. III.2.6.2, III.2.6.5, III.2.7.2). In diesem Kapitel wird kurz auf das Hefeexpressionssystem *Pichia pastoris* und die Durchführung der Fermentation V3P vom 16.06.1999 eingegangen.

Die Hefe *Pichia pastoris* ist ein leicht zu kultivierender und zu manipulierender Einzelzell-Organismus. Sie besitzt die Fähigkeit, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden. Der Methanol-Abbau erfolgt über das Enzym Alkoholoxidase (AOX).

Methanol wird zu Formaldehyd oxidiert. Zwei Gene, AOX1 und AOX2, kodieren die Alkoholoxidase. Das AOX1-Gen ist für 80 bis 90 % der Alkoholoxidase-Aktivität verantwortlich. Die Expression des AOX1-Gen wird durch Methanol als Kohlenstoffquelle ausgelöst (Eckert 1998, Invitrogen (a), Higgins 1998). Das Gen für die Expression von hVEGF₁₆₅ wurde über Plasmidvektoren in das chromosomale AOX1-Gen integriert. In Gegenwart von Methanol wird der AOX1-Promotor angeschaltet und die VEGF-Genexpression gestartet.

Bei der Fermentation V3P handelte es sich um eine sogenannte Hochzelldichtefermentation, die sich aus 3 Phasen zusammensetzte. In der Batch-Phase wurde zunächst das im Medium befindliche Glycerin von den Zellen verbraucht. Das Wachstum der Zellen konnte über die Zunahme der optischen Dichte im Fermenter und den Sauerstoffverbrauch beobachtet werden. Am Ende dieser Phase sollte ein OD₆₀₀-Wert zwischen 70 und 100 vorliegen. Der Anstieg des pO₂-Wertes von 0 auf 100 % war ein Zeichen dafür, daß das Zellwachstum aufgrund der erschöpften Kohlenstoffquelle stagnierte und mit der Glycerin-Fed-Batch-Phase begonnen werden mußte. In diese Phase wurde über eine Glycerin limitierte Zufütterung die Zelldichte weiter erhöht. Die Limitierung verhinderte, daß die Zellen Acetat und Milchsäure produzierten. Eine Verschiebung des pH-Wertes hätte ein Sterben der Zellen zur Folge gehabt. Nach dem Anstieg der optischen Dichte auf OD₆₀₀-Werte zwischen 150 und 200 wurde mit der letzten Phase der Fermentation begonnen. In der Methanol-Fed-Batch-Phase wurde durch die Zugabe von Methanol der Start der VEGF-Produktion induziert.

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Bedingungen aufgeführt, unter denen die Fermentation (V3P, 16.6.1999) des *Pichia* Mut^S-Stammes zur Produktion von rhVEGF₁₆₅ durchgeführt wurde. Die in diesem Kapitel erwähnten Materialien, Medien, Lösungen und Geräte wurden in der Diplomarbeit von K. Eckert ausführlich beschrieben (Eckert 1998).

Bedingungen:

Fermentationsvolumen:	2 l
Startvolumen:	1,8 l
pH-Wert:	5,3 mit 12,5 % Ammoniak eingestellt
Temperatur:	28 °C
Begasung:	1,25 vvm,
Rührer:	500 upm in der Batch-Phase, 750 upm in den anderen Phasen
Antischaum:	DC-AF-Emulsion (25%)
Feeding-Lösung:	Glycerin-Feeding: 50 % Glycerin-Lösung mit 12 ml/l YTM ₄ 2 ml/l Biotin-Lösung (0,2 g/l Biotin) Methanol-Feeding: 100 % Methanol + 12 ml/l YTM ₄
Feed-Rate:	Glycerin: 2,6 - 6 g/l/h Methanol: 0,9 g/l/h

1. Glycerin-Batch-Phase

Für die Vorkultur wurden 15 ml YPD-Medium mit Mut^S-Stamm 15 beimpft (Invitrogen (a)). Das Wachstum erfolgte in einem Schüttler mit 180 upm bei 30°C. Nach 20 h wurden 10 ml der Vorkultur in einen 1 l Erlenmeyerkolben mit 200 ml YPD-Medium gegeben und 5 h bei 30°C bei mit 180 upm inkubiert.

Für das Fermentationsmedium wurde eine 4 % ige Glycerin-Lösung angesetzt und im Fermenter autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 7,7 ml YTM₄ und 3,9 ml einer 500- fach konzentrierten Biotin-Lösung zugegeben. Der pH-Wert lag bei 2,8 und wurde mit Ammoniaklösung auf pH 5,3 eingestellt.

Anschließend wurde der Fermenter mit 100 ml Vorkultur ($OD_{600} = 1$) angeimpft. In

dieser Phase diente Glycerin den Zellen als Kohlenstoffquelle. Nach 23 h war die Kohlenstoffquelle erschöpft. Zu diesem Zeitpunkt lag die optische Dichte OD_{600} bei 104.

2. Glycerin-Fed-Batch-Phase (Glycerin-Limitierung):

Zu Beginn wurde die Glycerin-Feeding-Lösung mit einer Rate von 6 g/l/h zugegeben. Nach 6 h wurde die Glycerinzufuhr auf 2,6 g/l/h gedrosselt und für 16 h beibehalten. Nach 22 h lag die optische Dichte bei $OD_{600} = 185$.

3. Methanol-Fed-Batch-Phase (Induktion der Genexpression):

Nach Beenden des Glycerin-Feedings wurde mit der Zugabe der Methanol-Feeding-Lösung begonnen (0,9 g/l/h). In dieser Phase wurde von den Zellen sehr viel Sauerstoff verbraucht. Es wurde versucht, den pO_2 -Wert nicht unter 20 % absinken zu lassen. Nach 72 h Methanol-Feeding bzw. 119 h Gesamtdauer wurde die Fermentation beendet.

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung wurden Proben gezogen. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm von K. Eckert bestimmt. S. Marten bestimmte mit Hilfe einer HPLC-Anlage (HPX8-7h-Säule, 5 mM H_2SO_4 , 0,5 ml/min) die Methanol- bzw. Glycerinkonzentration.

IV Ergebnisse und Diskussion

1 Herstellung und Reinigung der rekombinanten Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden rhVEGF₁₆₅ bzw. rmVEGF₁₆₄, sFLT-1 und sKDR hergestellt und gereinigt. Diese Proteine wurden mit Hilfe des Baculovirus Expressions-systems in Insektenzellen hergestellt und über verschiedene Methoden gereinigt (Kap. III.2.1). Die Aufarbeitungen wurden in Zusammenarbeit mit C. Hornig, S. Donnini, T. Behn oder M. Johanson (GBF, Braunschweig) durchgeführt (Kap. III.2.1.2-4). Da die Herstellung und Reinigung der benötigten Proteine eine Voraussetzung, aber nicht ein Schwerpunkt dieser Arbeit war, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Methoden befindet sich in Kapitel II.2.1. Die einzelnen bei der Reinigung erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese und Western Blot Analyse auf Inhalt und Reinheit untersucht (Kap. III.2.3, III.2.4). Als Beispiel sind in dieser Arbeit ein Gel einer rhVEGF₁₆₅-Reinigung sowie ein Gel und ein Western Blot einer sFLT-1-Reinigung abgebildet (Abb. 20 - 22). Die Banden für sFLT-1 und rhVEGF₁₆₅ sind deutlich zu sehen. Die Gesamtproteinkonzentration nach der Aufreinigung wurde mit dem BCA-Assay von Pierce bestimmt (Kap. III.2.5). In Tabelle 7 sind die durchschnittlichen Werte für die Reinheit und Konzentration, sowie Ausbeute pro 500 ml Zellkulturüberstand für die verschiedenen Proteine aufgeführt. Die höchste Ausbeute wurde bei der Herstellung und Reinigung der Wachstumsfaktoren erzielt.

Tab. 7: Ergebnisse der Aufreinigung

Protein	Konzentration [mg/ml]	Ausbeute pro 500 ml Überstand	Reinheit [%]
VEGF	1 - 2	1 mg	90 - 95
sFLT-1	0,1 - 0,18	0,5 mg	75 - 90
sKDR	0,09 - 0,15	0,35 mg	60 - 90

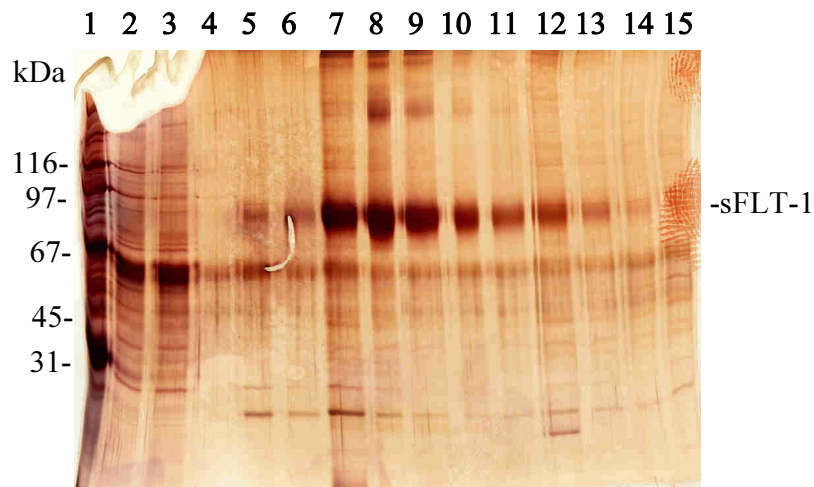


Abb. 20: SDS-Page Gel (10 % PAA) einer sFLT-1-Reinigung. Die Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel III.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Folgende Proben wurden auf zwei Gele aufgetragen: Standard (1), Ausgangsmaterial (2), Durchlauf (3), Waschfraktion (4) und die sFLT-1-Fractionen 7, 10 - 18 und 20 (5-15). Ein Gel wurde mit Silber gefärbt (diese Abb.) und das zweite Gel wurde für einen Westen Blot verwendet (Abb. 21)

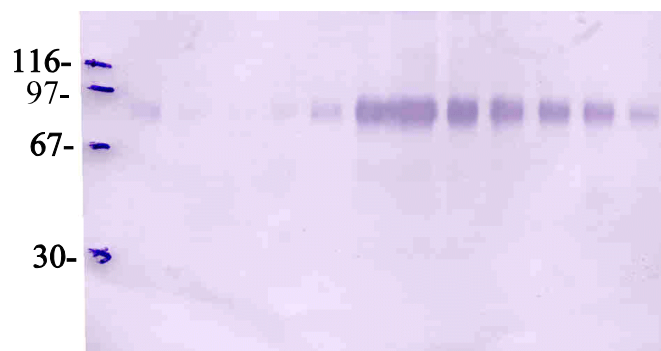


Abb. 21: Western Blot einer sFLT-1-Reinigung. Für den Blot wurde das zweite Gel, der in Abbildung 20 beschriebenen Elektrophorese, verwendet (Kap. III.2.4). Geringe sFLT-1-Mengen wurden im Ausgangsmaterial (2), den Fraktionen 7 und 10 (5, 6) sowie 17, 18 und 20 (13, 14) nachgewiesen. In den Fraktionen 11 - 13 wurde die größte Rezeptormenge gefunden.

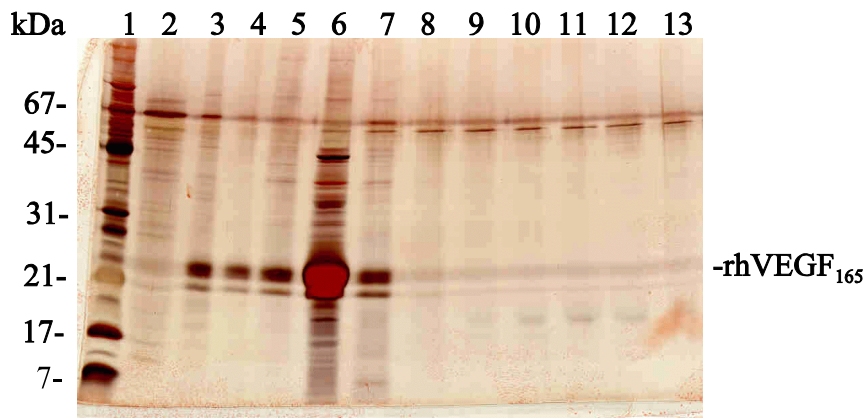


Abb. 22: SDS-Page Gel (15 % PAA) einer rhVEGF₁₆₅-Reinigung. Die Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel III.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Folgende Proben wurden aufgetragen: Standard (1), Durchlauf (2), Waschfraktion (3) und die eluierten VEGF-Fractionen 1 - 10 (4 - 13). Das VEGF-Monomer war in der Waschfraktion und in den eluierten Fractionen 1 - 4 deutlich zu sehen.

2 Vergleich von sFLT-1 und sKDR mit den Rezeptoren auf Zellen

Bevor Assays auf Basis der löslichen VEGF-Rezeptoren entwickelt werden konnten, mußte sichergestellt werden, daß sFLT-1 und sKDR in Bezug auf die Bindung von Liganden äquivalente Eigenschaften zu den vollständigen Rezeptoren FLT-1 und KDR haben. Besonders wichtig für die Assayentwicklung ist, daß das Protein, auf dem der Assay basiert, eine ausreichend hohe Affinität und Spezifität zu den Analyten besitzt. Die Sensitivität des Assays ist direkt abhängig von der Affinität der einzelnen Komponenten zueinander. Daher wurde zunächst das Bindungsverhalten und die Affinität der löslichen Rezeptorproteine untersucht.

2.1 Bestimmung der Affinität

2.1.1 Klassische Bindungsstudien auf Mikrotiterplatten

Mit Hilfe klassischer Bindungsstudien wurde die Affinität der beiden löslichen Rezeptorproteine zu rhVEGF₁₆₅ bestimmt (Kap. II.4.3.1). Dazu wurden Mikrotiterplatten mit sFLT-1 oder sKDR in Gegenwart von Heparin beschichtet und eine ¹²⁵J-VEGF₁₆₅-Verdünnungsreihe mit und ohne 50 fachen Überschuß an unmarkiertem VEGF₁₆₅ vermessen (Kap. III.2.6.1). Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen von der absoluten Signalthöhe ermittelt. Mit Hilfe der spezifischen Sättigungskurve (Abb. 23) wurde der gebundene und der freie Anteil ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ berechnet und als Scatchard Plot aufgetragen (Gl. 13, Kap. II.4.3.1).

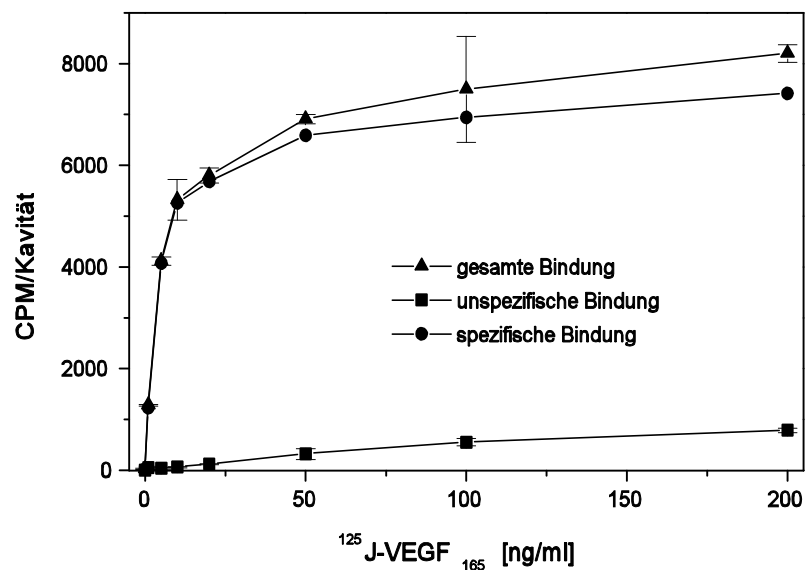


Abb. 23: Bindung von ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ an sFLT-1. Die spezifische Sättigungskurve wurde aus der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung ermittelt und für den Scatchard Plot verwendet.

Für die Bindung von $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ an sFLT-1 wurden mit Hilfe der Scatchard Plot Analyse aus den reziproken Steigungen der Geraden zwei K_D -Werte ermittelt (Abb. 24). Mit Gerade 1 wurden K_D -Werten zwischen 66 und 81 pM berechnet. Die Affinitätskonstante dieser hochaffinen Bindungsstelle schwankte in Abhängigkeit von der Rezeptorcharge. Über die Steigung der Geraden 2 wurde eine Affinitätskonstante von ca. 1 nM berechnet. Dieser Wert ist kritisch zu betrachten, da der Plot im Bereich größerer gebundener VEGF-Mengen nicht über ausreichend viele Meßwerte verfügt, um den zweiten K_D -Wert exakt zu ermitteln. Um eine Gerade durch den unteren Bereich des Plots legen zu können, mußte ein Meßwert verwendet werden, der sich bereits im Übergangsbereich zur ersten Geraden befand, daher dürfte die Affinitätskonstante zu klein sein.

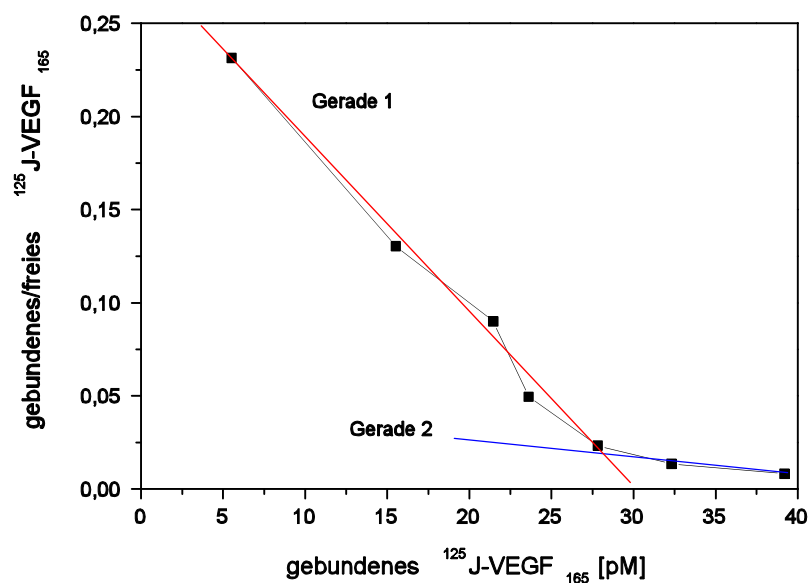


Abb. 24: Scatchard Plot der Bindung von $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ an sFLT-1 in Gegenwart von Heparin. Der Quotient aus gebundenem und freiem $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ wurde über die gebundene VEGF Menge aufgetragen. Durch die Kurve wurden zwei Geraden gelegt. Die reziproken Geradensteigungen entsprachen den K_D -Werten.

Interessant war der Scatchard Plot für die sKDR-VEGF-Bindung (Abb. 25). Der Kurvenverlauf deutete auf einen positiven kooperativen Effekt hin, d.h. die Bindung des ersten Liganden erleichtert die Bindung eines weiteren Liganden (Rehm 1996, Segel

1975). In diesem Fall sind die beiden Rezeptorbindungsstellen auf einem VEGF-Molekül als Liganden zu betrachten. Demnach wurde der Wachstumsfaktor zunächst von einem sKDR-Rezeptor und danach von einem zweiten gebunden. Bei der Bindung von rhVEGF₁₆₅ an sFLT-1 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Im Vergleich zu sKDR konnte von sFLT-1 bei gleicher Beschichtungsdichte eine größere Menge rhVEGF₁₆₅ gebunden werden.

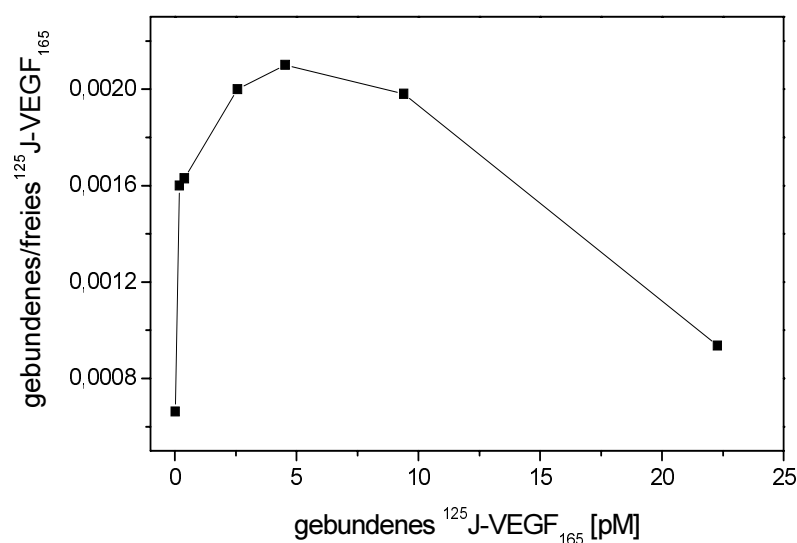


Abb. 25: Scatchard Plot der Bindung von ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ an sKDR. Durch diesen Plot konnten keine eindeutigen Geraden gelegt und somit keine K_D-Werte bestimmt werden.

Um ein auswertbares Signal-Rausch-Verhältnis für die Bindungsstudien von sKDR und rhVEGF₁₆₅ zu erhalten, mußte die doppelte Beschichtungsdichte wie bei den Experimenten mit sFLT-1 gewählt werden. Bei der Beschichtung der Platte wurden die Rezeptoren statistisch auf der Oberfläche verteilt. Die höhere Beschichtungsdichte verringerte den Abstand zwischen den einzelnen Rezeptorproteinen und erhöhte damit die Wahrscheinlichkeit, daß der Wachstumsfaktor von zwei Rezeptoren gebunden werden konnte. Da sich die K_D-Werte aus Scatchard-Plots wie in Abbildung 25 nur schwierig bestimmen lassen, wurden die K_D-Werte für die sKDR-VEGF- und die sFLT-1-VEGF- Bindung mit der Adair-Gleichung berechnet (Gl. 17, Kap. II.4.3.1). Mit dieser Methode

wurden zwei K_D -Werte von um 8 nM für die sKDR-VEGF-Bindung berechnet. Für die Bindung von VEGF an sFLT-1 wurde ein K_D -Wert im Bereich von 62 bis 71 pM und ein zweiter im Bereich von 50 bis 98 nM ermittelt.

2.1.2 Untersuchungen mit dem BIAcore-System

Neben den klassischen Methoden wurde auch das BIAcore-System zur Bestimmung der Affinitätskonstanten verwendet (Kap. II.4.2.2, II.4.3.2). Da es sich bei dem BIAcore-System um einen optischen Affinitätssensor handelt, bei dem die Signaländerung in Abhängigkeit von der Zeit erfaßt wird, konnten mit diesem System nicht nur die Affinitätskonstante sondern auch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- (k_a) und Dissoziationsreaktion (k_d) berechnet werden (Kap. II.4.3.2). Auf die Entwicklung und Kontrolle von BIAcore-Messungen wird in Kapitel IV.3.2 eingegangen. Für die kinetische Untersuchung wurden alle vier Fließzellen auf dem Sensor genutzt. Die erste Fließzelle diente als Referenzzelle. In den anderen Zellen wurden verschiedene, möglichst geringe Rezeptormengen immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene VEGF-Konzentrationen über den Sensorchip geleitet (Kap. III. 2.8.1). In Abbildung 26 ist die Anlagerung verschiedener Konzentrationen und die anschließende Dissoziation des Komplexes dargestellt.

BIAcore-Messungen basieren auf einer heterogenen Bindungsreaktion. Der freie Ligand VEGF muß zu dem immobilisierten sFLT-1-Rezeptor transportiert werden, bevor er von ihm gebunden werden kann. Die Bindungsrate, d.h. die Zunahme des Signals, kann durch den Massentransport limitiert werden. Nicht die sFLT-1-VEGF-Bindung, sondern der Transport des Liganden zum Rezeptor ist in diesem Fall der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion (Gl.32, Kap. II.4.3.2).

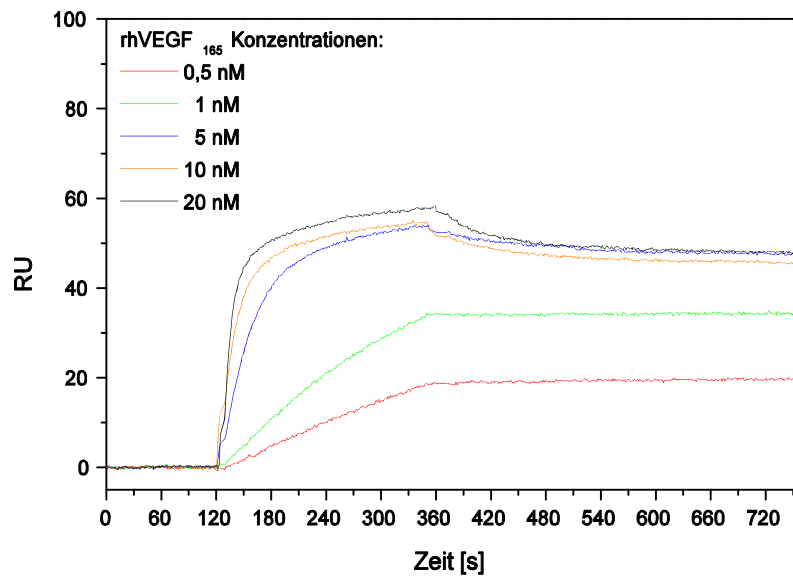


Abb. 26 : Kinetische Untersuchung der VEGF-FLT-1-Bindung im BIAcore. Dazu wurde die Anlagerung verschiedener rhVEGF₁₆₅ Konzentrationen in den einzelnen Fließzellen beobachtet. Die hier dargestellten Anlagerungen fanden in der vierten Fließzelle statt, in der 340 RU sFLT-1 immobilisiert waren.

Bindungskurven lassen sich in mehrere Phasen einteilen, die sich aus unterschiedlichen Konzentrations- und Massentransportverhältnissen zusammensetzten. In der ersten Phase, in der noch alle Bindungsplätze frei sind, wird die Anlagerung von der Massentransportgeschwindigkeit und nicht von der Geschwindigkeit der Bindungsreaktion bestimmt. Daher kann sie nicht für die Bestimmung der k_a -Werte verwendet werden. Massentransportlimitierte Bindungsreaktionen sind proportional der Liganden-Konzentration und äußern sich durch einen linearen Kurvenverlauf (Karlson 1993). Nachdem ein Teil der freien Bindungsplätze besetzt ist, wird eine Phase erreicht in der nicht der Transport, sondern die Anzahl der noch vorhandenen Bindungsstellen die Geschwindigkeit der Bindungsreaktion bestimmt. Aus diesem Bereich der Kurve kann die Assoziationsgeschwindigkeit ermittelt werden. Es folgt die Gleichgewichtsphase in der die Bindungsrate gleich Null ist. Nach der Anlagerung und dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes wird der Assaypuffer über den Sensor geleitet, um die Dissoziation des Komplexes zu beobachten. Die Dissoziation setzt sich wie die Anlagerung aus zwei Phasen zusammen. In der ersten Phase wird die Abnahme des Signals limitiert durch die

Geschwindigkeit, mit der der dissoziierte Wachstumsfaktor abtransportiert werden kann. Die zweite Phase ist nur noch vom Bindungsverhalten der Proteine abhängig und wird für die Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeit genutzt.

Die Bestimmung der k_a - und k_d -Werte erfolgte mit Hilfe der BIAevaluation-Software aus der Änderung der Signalthöhe in Abhängigkeit von der Zeit. Die Anlagerungskurven der VEGF-Konzentrationen von 20 bis 5 nM konnten für die Berechnung verwendet werden. Der lineare Verlauf der Anlagerungskurven von 0,5 und 1 nM rhVEGF₁₆₅ zeigte deutlich, daß hier über den ganzen Zeitraum der Anlagerung eine Massentransportlimitierung vorlag. Daher wurden sie nicht in die Berechnung einbezogen. Für die Bindung von rhVEGF₁₆₅ an sFLT-1 wurden k_a -Werte von 2,6 bis 5,7 $\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, k_d -Werte von 2,3 bis 3,1 $\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und eine Affinitätskonstante von 4,7 10^{-12} bis 1,2 $\times 10^{-11} \text{ M}$ berechnet.

Die Bestimmung der Affinitäts- und Geschwindigkeitskonstanten für die Wechselwirkungen zwischen sKDR und VEGF war nicht möglich. Die Bindung von rhVEGF₁₆₅ an sKDR ist stark heparinabhängig (Roeckl 1998). Der Rezeptor konnte über seine Aminogruppen auf der Sensoroberfläche fixiert werden. Die Immobilisierung von Heparin war aufgrund fehlender Aminogruppen nicht möglich, daher war die beobachtete Anlagerung des Wachstumsfaktors sehr gering. Versuche, Heparin in die rhVEGF₁₆₅-Lösung zu geben und um die Affinität zu steigern, schlugen fehl. Da Heparin genau wie die Sensoroberfläche negativ geladen war, konnte Heparin nicht in die Nähe der immobilisierten Rezeptorproteine gelangen.

2.1.3 Vergleich der Affinitätskonstanten

Im Vergleich zu den klassischen Methoden, Scatchard Plot und Adair-Gleichung, wurde mit dem BIAcore-System niedrigere Werte für die Affinitätskonstante und damit eine höhere Affinität ermittelt (Tab 7). Bei allen Methoden fand eine heterogene Bindungsreaktion statt, d.h. einer der Bindungspartner wurde auf einer Oberfläche fixiert und der andere wurde in der Lösung dazu gegeben. Während bei den klassischen Bindungsstudien die Rezeptoren auf der starren Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert wurden, erfolgte die Kopplung der Rezeptoren im BIAcore-System an eine flexible Dextranmatrix der Sensoroberfläche (Kap. II.4.2.2). Die Flexibilität der Matrix erhöhte die Wahrscheinlichkeit, daß ein VEGF-Molekül von zwei Rezeptorproteinen gebunden wurde. Dadurch wurde der Komplex stabiler, die Dissoziationskonstante und der K_D -Wert kleiner.

Tab. 8: Vergleich der berechneten Affinitätskonstanten

	Scatchard Plot	Adair-Gleichung	BIAcore-System
sFLT-1	66 - 81 pM	62 - 71 pM	4,7 - 12 pM
sKDR	-	8 nM	-

Die Berechnung des Bindungsverhältnisses in Abhängigkeit von der Rezeptordichte auf der Sensoroberfläche bestätigte, daß der Wachstumsfaktor teilweise von zwei Rezeptoren gebunden wurde (Tab. 9). Zunächst wurde die VEGF-Menge berechnet, die theoretisch bei einem Bindungsverhältnis von 1 : 1 von der immobilisierten Rezeptormenge gebunden werden könnte. Die in den Versuchen gemessenen Werte lagen deutlich darunter. Bei der Kopplung der Rezeptoren wurden einige Bindungsstelle beschädigt. Eine ungünstige Ausrichtung der Rezeptoren bei der Immobilisierung, führte dazu, daß die Bindungsstelle nicht mehr zugänglich war. Daher befanden sich auch sFLT-1 Moleküle auf der Oberfläche, die nicht in der Lage waren den Wachstumsfaktor zu binden. Wäre das Verhältnis von den gemessenen zu den theoretischen Werten konstant

gewesen, so wäre die Differenz durch den Anteil inaktiver Rezeptorproteine zu erklären gewesen. Mit steigender Beschichtungsdichte wurde der Unterschied zwischen den theoretischen und gemessenen Werten größer (Tab. 9). Eine Abschätzung des Bindungsverhältnisses von rhVEGF₁₆₅ zu sFLT-1 ergab, daß es sich mit steigender Beschichtungsdichte von 1 : 1 zu 1 : 2 verschob. Das maximal mögliche Bindungsverhältnis von Wachstumsfaktor zu Rezeptor lag bei 1 : 2. Ein Verhältnis von 2,6 sFLT-1-Proteinen pro VEGF-Molekül war nicht möglich. Bei der Berechnung des Bindungsverhältnisses waren alle Rezeptorproteine als aktiv angesehen worden. Um bei der Beschichtung mit 340 RU sFLT-1 ein Bindungsverhältnis von 1 : 2 zu erhalten, müssen mindestens 19 % der immobilisierten Rezeptoren inaktiv sein.

Tab. 9: Einfluß der Rezeptordichte auf die Art der Bindung

sFLT-1	gebundene VEGF-Menge [RU]		Anteil der gemessenen	Bindungsverhältnis
[RU]	theoretisch	gemessen	an der theoretischen	VEGF:sFLT-1
			Menge [%]	
109	51	35	68	1 : 1,5
194	93	45	48	1 : 2,1
340	163	62	38	1 : 2,6

Ein Vergleich der ermittelten Affinitätskonstanten (Tab. 8) mit den bisher beschriebenen Konstanten zeigte (Tab. 10), daß die K_D -Werte für sFLT-1 im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Werte lag. Mit Werten um 8 nM lag die für sKDR bestimmte Affinität jedoch deutlich darunter. Interessanterweise erstreckten sich die beschriebenen K_D -Werte für KDR über den Bereich von 50 pM bis 5 nM, während für FLT-1 nur K_D -Werte im Bereich zwischen 9 und 114 pM angegeben wurden.

Tab. 10: Verschiedene K_D -Werte für die Bindung von rhVEGF₁₆₅ an FLT-1 bzw. KDR

K_D -Werte		Referenz
FLT-1	KDR	
9 - 10 pM	770 - 1000 pM	HUVE Zellen Vaisman 1990, Olander 1991, Waltenberger 1994
10 - 114 pM	75 - 600 pM	transfizierte Zelllinien Terman 1994, Sawano 1996, Quinn 1993, Seetharam 1995
19 - 25 pM	51 - 150 pM	IgG Chimera, Dimere Park 1994, Kaplan 1997, Fuh, 1998
20 pM	5 nM	monomere Rezeptor-proteine Kendall 1993, Fuh 1998

Eine Erklärung für die unterschiedlichen K_D -Werte konnten die Bedingungen liefern, unter denen ihre Bestimmungen durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den monomeren löslichen Rezeptorproteinen sFLT-1 und sKDR gearbeitet. Waltenberger, Terman und andere Wissenschaftler verwendeten Zellen mit vollständigen Rezeptoren (Tab. 10). Kaplan und Park dagegen bestimmten die Affinitätskonstanten mit Hilfe von Rezeptor-IgG-Chimeren (Tab. 10). Hierbei handelte es sich um dimere Glycoproteine, die über die Hinge Region der schweren Kette (Kap. II.2) dimerisiert waren (Kaplan 1997, Fuh 1998). Bei den Messungen mit Rezeptor-IgG-Chimeren lagen die Rezeptoren als Dimere vor. Bei den Untersuchungen auf Zellbasis, dürfte eine Rezeptordimerisierung stattgefunden haben, da die Signalübertragung über FLT-1 bzw. KDR Dimere abläuft (Kap. II.1.2). Von Rezeptordimeren konnte VEGF stärker gebunden werden als von einzelnen Rezeptoren. Die Bindung von VEGF an ein Rezeptordimer führte zu einer größeren Komplexstabilität, der Abnahme des Dissoziationsgeschwindigkeit und somit zu einer höheren Affinitätskonstante.

Während sowohl monomeres als auch dimeres FLT-1 in der Lage waren, eine hochaffine Bindung mit VEGF einzugehen, schien im Fall von KDR eine Rezeptordimerisierung die Voraussetzung für eine hochaffine Bindung des Wachstumsfaktors sein. Die

Vermutung wurde durch die Experimente von Fuh bestätigt (Fuh 1998). Sie hatte Vergleichsmessungen mit verschiedenen KDR-IgG-Chimeren und monomeren KDR-Proteinen durchgeführt. Für die Bindung des Wachstumsfaktors an die KDR IgG-Chimeren erhielt sie K_D -Werte um 51 pM und für die Bindung der monomeren Rezeptorproteine K_D -Werte um 5 nM.

2.2 Bindung der physiologischen Liganden an die löslichen Rezeptoren

Es wurde untersucht, wie sich die löslichen Rezeptorproteine sFLT-1 und sKDR gegenüber den natürlichen Bindungspartnern der Rezeptoren verhalten. Neben VEGF-A und VEGF-B wird zusätzlich PlGF-2, das 53 % Homologie zu VEGF-A zeigt, von FLT-1 erkannt (Park 1994). KDR bindet ausschließlich Mitglieder der VEGF-A, VEGF-C und der VEGF-E Familie (Ferrara 1996 und 1997, Neufeld 1999, Hornig 1999). Von den verschiedenen VEGF-Formen sind VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁, beide gehören zur VEGF-A Familie, die am ausführlichsten charakterisierten und am weitest verbreiteten Mitglieder der gesamten VEGF-Familie (Ferrara 1996, Ferrara 1997). Aufgrund ihrer biologischen Wirkung sind sie von großem analytischen Interesse (Kap. I., Kap. II.1). In den folgenden Abbildungen ist deutlich zu sehen, daß VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ sehr gut von sFLT-1 und sKDR erkannt wurden (Abb. 27 - 28). VEGF₁₂₁ konnte 70 - 80 % und VEGF₁₆₅ über 90 % des radioaktiv markierten VEGFs verdrängen. Der beobachtete Unterschied zwischen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ läßt sich durch ihre Struktur und den Versuchsaufbau erklären. VEGF₁₆₅ besitzt im Gegensatz zu der kleineren Isoform (Kap. II.1.1) eine Heparin bindende Domäne. Für diese Untersuchungsreihe war VEGF₁₆₅ radioaktiv markiert und die Mikrotiterplatte unter Zusatz von Heparin mit dem löslichen Rezeptoren beschichtet worden. VEGF₁₆₅ kann daher mit einer höheren Affinität und Stabilität als VEGF₁₂₁ gebunden werden. Unter diesen Bedingungen ist rhVEGF₁₂₁ ein schwächerer Kompetitor als rhVEGF₁₆₅.

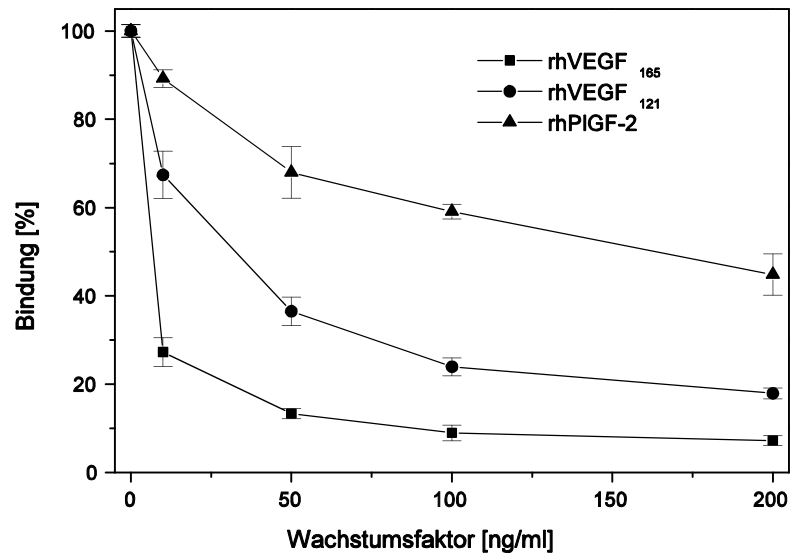


Abb. 27: Konkurrenz von $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ durch verschiedene Konzentrationen rhVEGF_{165} , rhVEGF_{121} und rhPIGF-2 auf einer sFLT-1 und Heparin beschichteten Platte.

Für die Experimente mit sKDR mußte aufgrund der geringeren Affinität die doppelte Beschichtungsdichte gewählt werden. Dadurch befand sich eine größere Anzahl möglicher Bindungsstellen für VEGF auf der Oberfläche und man erhielt ein Signal-Rausch-Verhältnis, das eine sichere Auswertung erlaubte. Die unterschiedliche Beschichtungsdichte von sFLT-1 und SKDR mußte beim Vergleich der Kompetitorstärke berücksichtigt werden. Ein Vergleich des kompetitiven Effekts bei 50 ng/ml Wachstumsfaktor auf der mit sKDR und bei 25 ng/ml auf der sFLT-1 beschichteten Platte zeigte, daß sich VEGF_{121} und VEGF_{165} auf beiden Platten ähnlich verhielten.

PIGF-2 konnte nur auf der sFLT-1 beschichteten Platte $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ verdrängen. Aus den Messungen ergaben sich folgende Affinitätsabstufung: $\text{VEGF}_{165} > \text{VEGF}_{121} > \text{PIGF 2}$ für sFLT-1 und $\text{VEGF}_{165} > \text{VEGF}_{121} \gg \text{PIGF-2}$ für sKDR.

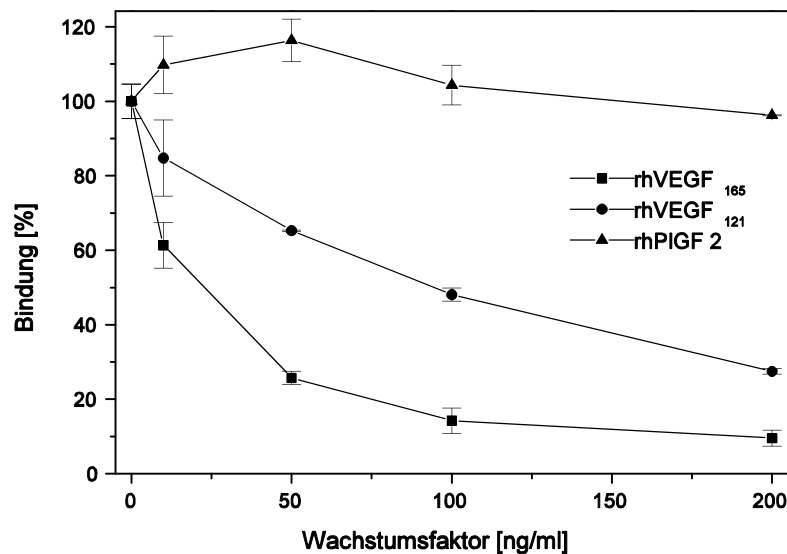


Abb. 28: Konkurrenz von ^{125}J -VEGF₁₆₅ durch verschiedene Konzentrationen rhVEGF₁₆₅, rhVEGF₁₂₁ und PIGF-2 auf einer sKDR und Heparin beschichteten Platte.

Der Vergleich der Affinitätskonstanten von sKDR und sFLT-1 zu VEGF sowie der Vergleich der Affinität der physiologischen Bindungspartner zu beiden löslichen Rezeptoren zeigen, daß Assays auf Basis von sFLT-1 einige Vorteile gegenüber denen auf Basis von sKDR haben. So eröffnet der Einsatz von sFLT-1 die Möglichkeit, neben VEGF auch PIGF zu detektieren. Die höhere Affinität läßt zudem eine größere Assay-sensitivität erwarten. Hinzu kommt, daß sich sFLT-1 leichter in großen Mengen herstellen und reinigen läßt. Dies ist wichtig, wenn der Assay häufig genutzt und ggf. kommerzialisiert werden soll.

2.3 Direkter experimenteller Vergleich zwischen dem Zell- und dem Rezeptorassay

Um die Frage bezüglich der Übereinstimmung und den möglichen Unterschieden beim Einsatz von humanen Endothelzellen oder löslichen VEGF-Rezeptoren in Bindungs- bzw. Inhibitionsexperimenten zu klären, wurden eine Reihe paralleler Untersuchungen

mit verschiedenen VEGF-Formen und Inhibitoren durchgeführt (Kap. III.2.6.1). Die im Zellassay verwendeten Endothelzellen tragen sowohl FLT-1- als auch KDR-Rezeptoren. Für die Rezeptorassays wurden die Mikrotiterplatten entweder mit sFLT-1 oder sKDR beschichtet.

2.3.1 Vergleich bekannter Bindungspartner

Eine große Anzahl verschiedener VEGF-Proben wurden hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens in beiden Assayformaten untersucht. Bei den Proben handelte es sich um VEGF aus unterschiedlichen Produktionen und Aufreinigungen. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Der Zellassay und der Rezeptorassay zeigten, mit Ausnahme des dimeren VEGF₁₂₁ (-▼-), eine gute Übereinstimmung.

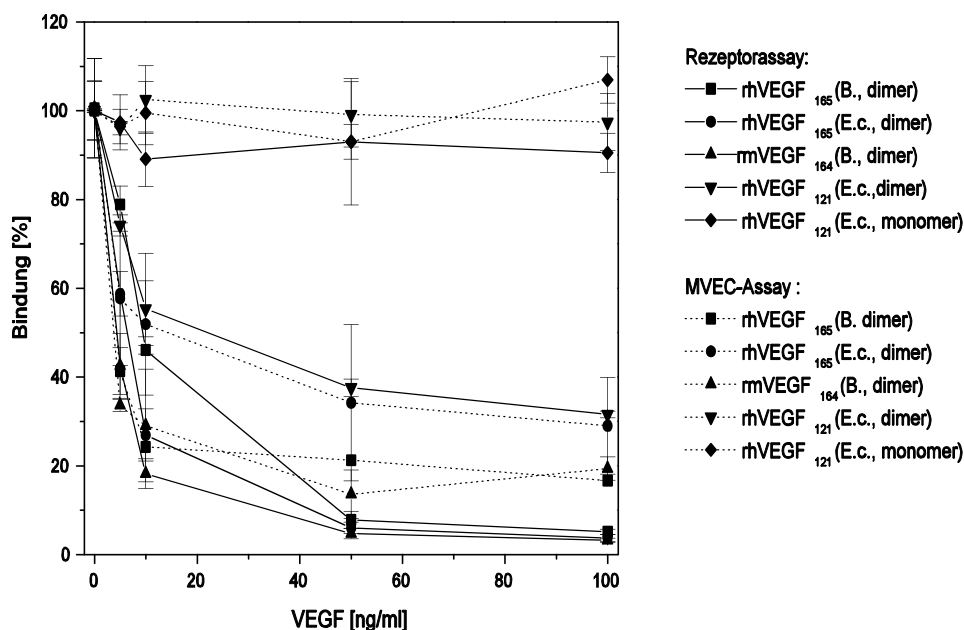


Abb. 29: Konkurrenz von ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ durch verschiedene VEGF Proben. In diesem Experiment konkurrierten der radioaktiv markierte Wachstumsfaktor und die unterschiedlichen VEGF Formen um die vorhandenen Bindungsstellen auf den Rezeptoren der MVE-Zellen bzw. dem auf der Platte immobilisierten sFLT-1 Rezeptor.

Es fällt auf, daß der kompetitive Effekt im Zellassay schwächer als im Rezeptorassay ausfiel. Grund dafür war das unterschiedliche Bindungsstellenangebot in beiden Assays. Endothelzellen tragen neben den hochaffinen Rezeptoren KDR und FLT-1 auch eine Reihe Substanzen niederer Affinität. Neuropilin, Heparin, Heparansulfate und andere Substanzen haben eine niedrige, aber spezifische Affinität zu bestimmten Liganden (Gita-Goren 1992, Terman 1994, Soker 1998).

Soker konnte zeigen, daß Neuropilin VEGF₁₆₅ nicht aber VEGF₁₂₁ binden kann (Soker 1998). Im Zellassay konnte die VEGF-FLT-1-Bindung von Neuropilin und Heparin unterstützt werden. VEGF₁₂₁, das weder eine Bindestelle für Neuropilin noch für Heparin besitzt, konnte daher ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ nicht von der Zelloberfläche verdrängen. Beim Rezeptorassay befand sich nur sFLT-1 und Heparin auf der Oberfläche, daher wurde ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ von VEGF₁₂₁ teilweise verdrängt. Das größere Angebot an Bindungsstellen auf den Zellen führte auch dazu, daß der kompetitive Effekt bei allen Proben kleiner ausfiel als im Rezeptorassay.

Wie erwartet, zeigte das monomere VEGF₁₂₁ in beiden Formaten keinen Effekt. VEGF gehört wie PDGF, TGF-β, NGF und andere Wachstumsfaktoren zur Superfamilie der Cystein-Knoten-Wachstumsfaktoren (Kap. II.1.1). Die Mitglieder dieser Familie haben nur eine geringe Sequenzhomologie. Ihnen gemeinsam ist, daß ihre Cysteine über Disulfidbrücken ein dreidimensionales Cystein-Knoten-Motiv bilden. VEGF ist, wie alle Proteine dieser Familie, nur in der dimeren Form biologisch aktiv (Sun und Davis 1995, Pötgens 1994, Muller 1997).

Bereits 1990 (Shibuya 1990) konnte natürlich vorkommendes sFLT-1 nachgewiesen werden. Bisher ist seine genaue physiologische Rolle unklar. Da sFLT-1 z.B. in großen Mengen im Fruchtwasser schwangerer Frauen vorkommt (Banks 1998, Hornig 1999), wird vermutet, daß sFLT-1 während der Schwangerschaft als VEGF Antagonist im weiblichen Zyklus fungiert. Aiello, Ferrara und Gerber konnten bereits in Tierversuchen *in vivo* und *in vitro* auf MVE-Zellen zeigen, daß dimere sFLT-1-IgG Chimera VEGF inhibieren können (Aiello 1995, Ferrara 1998, Gerber 1999). Auch das in dieser Arbeit

verwendete monomere, lösliche Rezeptorprotein sFLT-1 ist in der Lage die Bindung von VEGF an die Rezeptoren der MVE-Zellen zu blockieren (Roeckl 1998).

Nun sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch mit einem Rezeptorassay, basierend auf sFLT-1, erfaßt werden kann. Damit könnte dieses Assayformat ebenfalls für den Nachweis von löslichem FLT-1 in biologischen Proben und für die Qualitätskontrolle rekombinant hergestellter sFLT-1 Proteine genutzt werden. Für diese Experimente wurde sFLT-1 unterschiedlicher Qualität, d.h. aus verschiedenen Aufreinigungen, zusammen mit $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ auf einer mit sFLT-1 und Heparin beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert und der kompetitive Effekt der einzelnen Chargen erfaßt (Abb. 30).

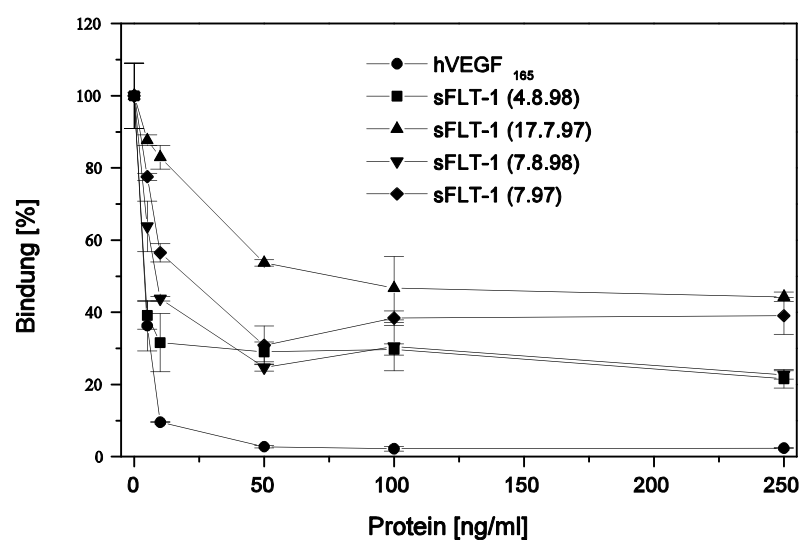
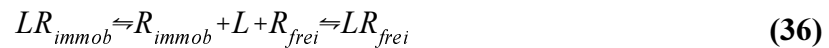


Abb. 30: Konkurrenz von $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ durch verschiedene sFLT-1 Chargen. Auf der Oberfläche immobilisierte sFLT-1 Rezeptoren und frei in Lösung befindliche sFLT-1 Rezeptoren konkurrieren um $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$.

In diesem Experiment konkurrierten die immobilisierten (R_{immob}) und die in Lösung befindlichen Rezeptoren (R_{frei}) um das vorhandene $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ (L). In Abhängigkeit von der biologischen Aktivität der Rezeptoren stellte sich ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Bindungspartnern ein:



Je nach biologischer Aktivität verschob sich das Gleichgewicht. Der kompetitive Effekt war direkt proportional zur biologischen Aktivität und somit der Qualität der einzelnen Rezeptorchargen. Bei den entsprechenden Untersuchungen mit dem Zellassays wurde der gleiche Effekt beobachtet.

Eine weitere Möglichkeit die beiden Formate zu vergleichen, war die interessante Feststellung, daß es Peptide gibt, mit denen ein biologisches Signal ausgelöst oder die Rezeptor-Ligand-Bindung teilweise inhibiert werden konnte. So haben Jonca und Plouët gezeigt, daß sowohl VEGF_{189} als auch ein Peptid, basierend auf der Exon 6 Sequenz, an der Zelloberfläche binden können und zur Freisetzung von bioaktiven FGF-2 (fibroblast growth factor 2) führen (Jonca 1997, Plouët 1997). Die Exon 6 Sequenz ist stark basisch und verantwortlich für die Bindung an die Zellmatrix. Diese Sequenz existiert in VEGF_{189} und VEGF_{206} , die nur gebunden an die Zelloberfläche und nicht sekretiert vorliegen. Daß Heparin die Bindung von VEGF, mit Ausnahme von VEGF_{121} , an seine Rezeptoren KDR und FLT-1 beeinflusst, ist schon seit längerem bekannt (Gita-Goren 1992, Tessler 1994, Roeckel 1998). Die heparinbindende Domäne von VEGF findet sich in der Exon 7 Sequenz.

Mit Peptiden, basierend auf der Exon 6 Sequenz und dem N-terminalen Bereich der Exon 7 Domäne, wurde bereits in der Promotion von C. Schöllmann gearbeitet (1992). Dabei wurde festgestellt, daß das Exon 7 Peptid keinen Einfluß auf die Bindung von VEGF an die Endothelzellrezeptoren hatte. Aber mit Hilfe des Exon 6 Peptides konnte die Bindung blockiert werden. Um zu untersuchen, ob sich dieser Effekt auch mit dem

Rezeptorassay beobachten läßt oder ob dazu die gesamte Zellmatrix notwendig ist, wurden der Einfluß von Exon 6 und Exon 7 Peptid in beiden Assayformaten untersucht (Abb. 31).

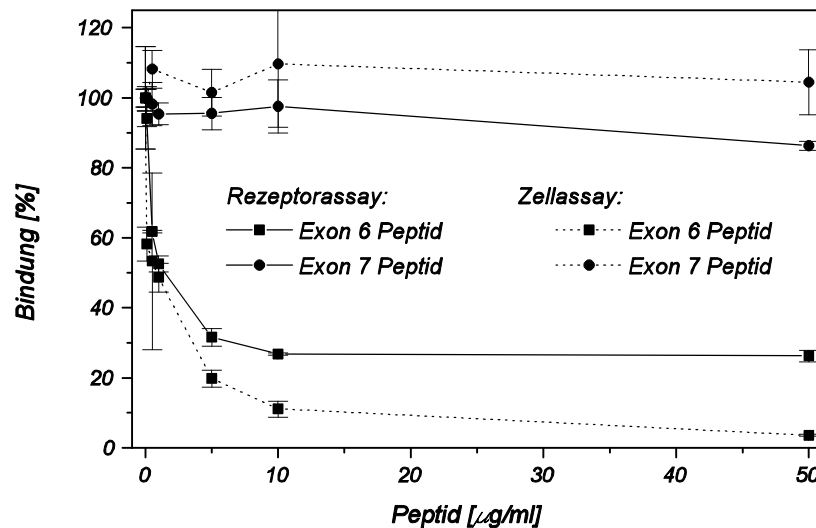


Abb. 31: Einfluß des Exon 6 und Exon 7 Peptids auf die Bindung von 125 I-J-VEGF₁₆₅ an die Rezeptoren der MVE-Zellen bzw. an den in Gegenwart von Heparin immobilisierten sFLT-1 Rezeptor.

Interessanterweise konnte das stark basische Exon 6 Peptid die VEGF-Rezeptor-Bindung in beiden Assays blockieren, wobei dieser Effekt im Zellassay deutlich größer war. Möglicherweise läßt sich diese Beobachtung durch elektrostatische Wechselwirkungen erklären. Sie sind häufig der Grund für "unspezifische" Wechselwirkungen (Tijssen 1985). Mit einem pI um 10 ist sFLT-1, genau wie das Exon 6 Peptid, stark basisch. Bei dem neutralen pH-Wert im Assay sind beide daher positiv geladen, wohingegen Heparin aufgrund seiner Sulfatgruppen negativ geladen ist.

Kaplan vermutet, daß das negativ geladene Heparin die Rezeptordimerisierung über den Ausgleich der positiven Ladungen der Rezeptoren unterstützt (Kaplan 1997). In Anlehnung an das Modell von Kaplan wäre folgendes möglich:

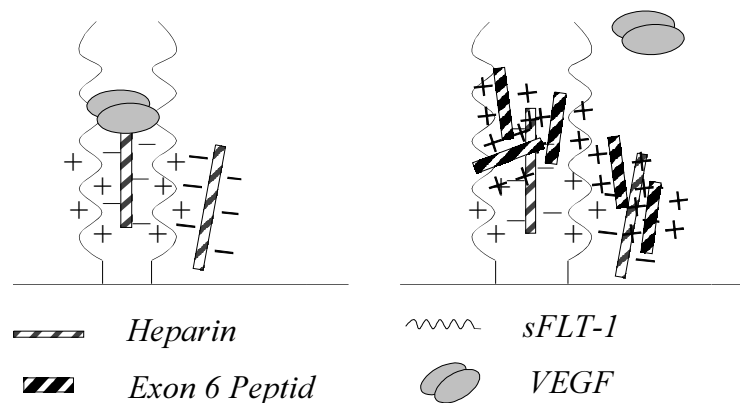


Abb. 32: Mögliche Wechselwirkungen zwischen sFLT-1, Heparin und dem Exon 6 Peptid.

Die negativen Ladungen des Heparin könnten gleichzeitig mit dem positiv geladenen sFLT-1-Rezeptor und dem positiv geladenen Exon 6 Peptid wechselwirken. Das Exon 6 Peptid, das in einem starken Überschuß eingesetzt wurde, könnte also über elektrostatische Kräfte auf der Oberfläche gebunden werden und dadurch die Bindungsstelle für VEGF auf dem Rezeptor blockieren. Das Exon 7 Peptid ist aufgrund der gewählten Aminosäuresequenz neutral bis sehr schwach basisch. Elektrostatische Wechselwirkungen sind hier nicht möglich.

2.3.2 Mögliche Inhibitoren der VEGF-Rezeptor-Bindung

Verschiedene Antikörper gegen VEGF und KDR wurden daraufhin getestet, inwieweit sie eine neutralisierende Wirkung haben. Neutralisierende Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie an das gleiche oder ein nahe gelegenes Epitop wie der Rezeptor bzw. der Ligand binden und somit die Bindung des Liganden an den Rezeptor verhindern und die Signalübertragung unterbrechen. Diese Antikörper sind von großem Nutzen bei der Untersuchung von Signalwegen und der Behandlung von Erkrankungen, denen eine fehlgesteuerte Signalübertragung zu Grunde liegt. Von den untersuchten Anti-KDR-Antikörpern (Tab. 11) zeigte der Antikörper 212 (Abb. 33) in beiden Assay-

formaten die größte neutralisierende Wirkung. In Abbildung 33 ist zu sehen, daß bei gleicher Antikörperkonzentration der blockierende Effekt im Rezeptorassay größer war als im Zellaassay. So wurden bei einer Verdünnung von 1 : 50 67 % der Bindungsstellen im Rezeptorassay, aber nur 45 % der Bindungsplätze auf den Zellen blockiert.

Diese Differenz ergab sich aus dem unterschiedlichen Angebot an Bindungsstellen in beiden Assayformaten. Während sich im Rezeptorassay nur sKDR in Gegenwart von Heparin auf der Oberfläche befand, boten die verwendeten Endothelzellen eine Reihe unterschiedlicher Bindungsmöglichkeiten. Neben den hochaffinen VEGF-Rezeptoren KDR und FLT-1, gab es auch eine Reihe von Substanzen und Proteinen niedrigerer Affinität wie z.B. Neuropilin, Heparin und Heparansulfate, an die VEGF ebenfalls binden konnte (Gita-Goren 1992, Terman 1994, Soker 1998). Durch den Anti-KDR-Antikörper wurden nur die Bindungsstellen auf dem KDR Rezeptor blockiert. FLT-1 stand beispielsweise weiterhin als Bindungspartner für VEGF zur Verfügung.

Tab. 10. Test verschiedener Antikörper hinsichtlich ihrer neutralisierenden Wirkung

Antikörper		Verdrängung [%]	
		Zellaassay	Rezeptorassay
Anti-KDR 212	Serum 1 : 50	45	67
Anti-KDR 275.11	1 : 40 bzw 1 : 50	50	48
Anti-KDR 260.4	1 : 50	- ¹	19
Anti-VEGF K7	Serum 1 : 50 - 1 : 25	63 - 57	39 - 24
Anti-VEGF R4.6.1	5 - 5000 ng/ml	- ¹	0 - 74

¹ Meßwert nicht vorhanden

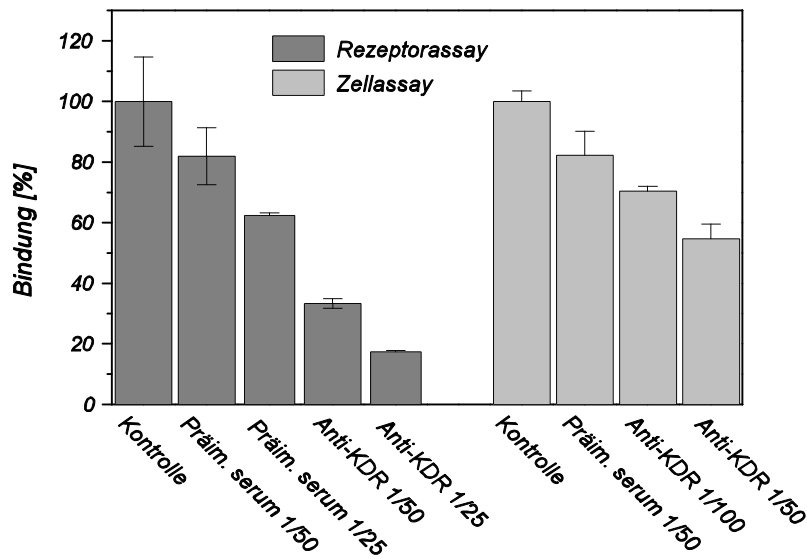


Abb. 33: Test des Anti-KDR Antikörpers 212 auf seine neutralisierende Wirkung. Verschieden Verdünnungen des Präimmun- und des Anti KDR Serums wurden auf einer mit sKDR und Heparin beschichteten Platte bzw. auf MVC-Zellen 15 min. vorinkubiert. Dann wurde $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ zugegeben und das Gemisch nochmal für 2 h bei RT auf der Platte inkubiert

Im Rezeptorassay konkurrierten der Anti-KDR Antikörper (Ak) und das $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ (L) um die Bindungsstellen auf dem löslichen Rezeptor sKDR (R_1). Im Zellassay fanden mehrere Reaktionen gleichzeitig statt. Der Anti-KDR-Antikörper (Ak) und $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ (L) konkurrierten um sKDR (R_1) und gleichzeitig konkurrierten weitere Rezeptoren (R_2) wie z.B. FLT-1 um $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ (L).



Im Zellassay hatte der Ligand $^{125}\text{J-VEGF}_{165}$ im Gegensatz zum Rezeptorassay alternative Bindungsmöglichkeiten zum blockierten KDR-Rezeptor. Daher fiel der beobachtete kompetitive Effekt im Zellassay geringer aus. Anhand dieser Ergebnisse war zu sehen, daß es mit Hilfe neutralisierender Antikörper möglich ist, gezielt bestimmte Signalwege zu blockieren. FLT-1 und KDR haben eine unterschiedliche biologische Bedeutung (Kap. II.1.2). Daher kann je nach Antikörper der eine oder der andere Signalweg blockiert werden.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, eine Rezeptor-Ligand-Bindung zu verhindern. Neben dem Rezeptor können auch die Bindungsstellen auf dem Liganden blockiert werden. Es wurde untersucht, ob die Anti-VEGF-Antikörper K7 und R4.6.1 dazu genutzt werden können, wobei Anti-VEGF-Antikörper R4.6.1 nur im Rezeptorassay untersucht wurde (Tab. 11). In Tabelle 12 ist zu sehen, daß beide Antikörper eine neutralisierende Wirkung haben. Interessanterweise wurde bei den Experimenten mit Anti-VEGF-Antikörper K7 im Zellassay ein größerer Effekt beobachtet.

Tab. 12: Test des Anti-VEGF-Antikörpers K7

Antikörper	Serum	Verdrängung [%]	
		Zellassay	Rezeptorassay
K7	1 : 50	57	24
	1 : 25	63	39
	1 : 10	-	64

2.3.3 Ergebnis der Vergleichsmessungen

Die Messungen zeigen deutlich, daß das Bindungsverhalten von VEGF zu Endothelzellen und zu seinen löslichen rekombinanten Rezeptorproteinen sehr ähnlich ist. Assays auf Basis der löslichen Rezeptoren sFLT-1 und sKDR sind also eine gute Möglichkeit,

die biologische Aktivität rekombinant hergestellter Proteine zu prüfen und Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu untersuchen. Sie bieten sogar einige Vorteile gegenüber den Zellassays. Die Standardabweichungen in Rezeptorassays lagen bei maximal 10 %, während sie im Zellassay bis zu 20 % betragen konnten. Auch bezüglich ihrer schnellen Verfügbarkeit waren sie vorteilhaft. Untersuchungen mit dem Zellassay mußten 3 bis 4 Tage vorher vorbereitet werden, um eine Platte mit einer ausreichenden Zelldichte für die Experimente zu haben (Kap. II.2.9). Im Gegensatz dazu wurden die Platten für den Rezeptorassay erst am Vortag beschichtet. Spätere Stabilitätsuntersuchungen zeigten, daß die mit den Rezeptorproteinen beschichteten Platten nach dem Blockschrift lyophilisiert und gelagert werden konnten und somit auch kurzfristig zur Verfügung standen (Kap. IV.3.1.2). Um einen Assay zu erhalten, der sehr einfach und überall durchzuführen ist, war es allerdings notwendig, ein nicht radioaktives Assayformat zu entwickeln, das auf löslichen Rezeptorproteinen basiert.

3 Rezeptorassays

Basierend auf den löslichen Rezeptorproteinen sFLT-1 und sKDR wurden verschiedene nicht radioaktive Assayformate für den Nachweis von biologisch aktiven rhVEGF₁₆₅ bzw. rmVEGF₁₆₄ entwickelt. Die Rezeptorassays wurden als Relida (**R**ezeptor-**L**igand-**I**nteraktion **D**etektions**a**ssay) bezeichnet.

3.1 Mikrotiterplattenassays

Da Mikrotiterplattenassays in der Umweltanalytik und der medizinischen Diagnostik Stand der Technik sind, wurden zunächst Rezeptorassays in Anlehnung an diese Assayformate entwickelt. Der Aufbau von Mikrotiterplattenassays kann in einem kompetitiven oder nicht kompetitiven Format erfolgen (Kap. II.4.2).

3.1.1 Kompetitiver Rezeptorassay

Für den Aufbau eines kompetitiven Assayformates wurde ein geeigneter Tracer benötigt (Kap. II.4.2.1). Durch die Kopplung von Peroxidase (POD) an rmVEGF₁₆₄, welches die gleichen Bindungseigenschaften wie rhVEGF₁₆₅ besitzt (Shima 1996), wurde dieser selbst hergestellt (Kap. III.2.2.2). Da es sich bei allen Mitgliedern der VEGF-Familie um disulfidverbrückte Dimere handelt, wurde das Konjugat sowohl nach Vorschrift, d.h. unter reduzierenden Bedingungen, als auch unter modifizierten Bedingungen ohne Einsatz reduzierender Substanzen hergestellt. Beide Konjugate konnten für den Nachweis von VEGF mit Hilfe eines Rezeptorassays, basierend auf sFLT-1, verwendet werden (Abb. 34). Allerdings lag das Detektionslimit des kompetitiven Assays deutlich unter dem Detektionslimit des Relidas im Sandwichformat (Kap. IV.3.1.2). Hier wurde mit einer sFLT-1 beschichteten Platte ein Detektionslimit kleiner 1 ng/ml und ein IC₅₀-Wert zwischen 7 und 20 ng/ml erreicht. Mit derselben Beschichtung konnte im kompetitiven Rezeptorassay ein Detektionslimit um die 60 ng/ml erreicht werden. Der IC₅₀-Wert konnte trotz einer Standardreihe bis 2 µg/ml nicht bestimmt werden.

Die Analyse der Konjugate mit einer Gelelektrophorese zeigte, daß neben gekoppeltem VEGF auch noch ungekoppelter Wachstumsfaktor vorlag. Da im Assay auch dieses unmarkierte VEGF, das nicht nachgewiesen werden konnte, mit dem VEGF-POD-Konjugat und der Probe bzw. dem Standard um die freien Bindungsplätze konkurrierte, wurde das Detektionslimit des Assays höher und der Assay damit schlechter. Um den kompetitiven Relida für analytische Zwecke nutzen zu können, war es notwendig, das Detektionslimit und den IC₅₀-Wert zu verbessern. Es bot sich an, die Konjugatherstellung zu optimieren und ggf. die Konjugate z.B. über Gelfiltration zu reinigen, um noch ungekoppeltes VEGF bzw. POD zu entfernen. Da es im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, diese Arbeiten selbst durchzuführen, wurden die Herstellung des VEGF-POD-Konjugates und die Optimierung des kompetitiven Assays von M. Johanson im Rahmen einer Diplomarbeit behandelt (Johanson 1999). Die Ergebnisse der Arbeit wurden zum Vergleich verschiedener Formate herangezogen (Kap. IV.3.3).

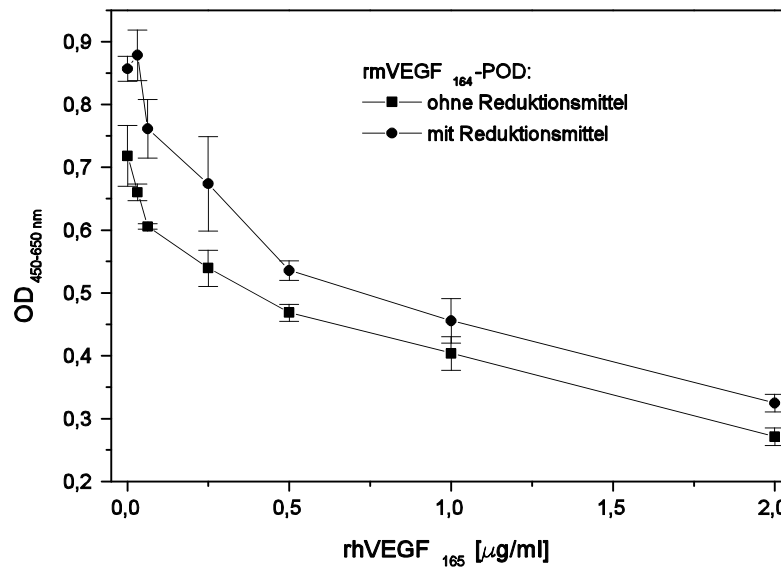


Abb. 34: Konkurrenz von rmVEGF-POD mit rhVEGF auf einer mit sFLT-1 und Heparin beschichteten Platte. Die Herstellung des Konjugates erfolgte zum einen unter reduzierenden Bedingungen mit NaCNBH₃ und Ethanolamin und zum anderen ohne Reduktionsmittel und Lysin zur Absättigung der aktivierten Peroxidase (Kap. III.2.2.2). Die Durchführung des Assays wird in Kapitel III.2.6.3 beschrieben.

3.1.2 Rezeptorassays im Sandwichformat

Für den Aufbau eines Assays im Sandwichformat wurden zwei verschiedene VEGF-Bindungspartner benötigt, die mit unterschiedlichen Epitopen des VEGFs wechselwirken und sich somit nicht gegenseitig bei der Bindung an den Wachstumsfaktor behindern (Kap. II.4.2.1). Als Fänger auf der Mikrotiterplatte wurden, wie im kompetitiven und im radioaktiven Assay, die löslichen Rezeptorproteine verwendet (Kap. IV.3.1.1, Kap. IV.2). Um gebundenes VEGF nachweisen zu können, mußte ein Peroxidase-markierter-Anti-VEGF-Antikörper bzw. eine Kombination aus Anti-VEGF-Antikörper und einem sekundären Peroxidase-markierten-Antikörper gefunden werden, der bzw. die nicht an dasselbe oder ein nahegelegenes Epitop wie die Rezeptoren binden.

Zunächst wurden die zu diesem Zeitpunkt kommerziell erhältlichen bzw. die von H. Weich (GBF, Braunschweig) und R. Bicknell (John Radcliffe Hospital, Oxford, UK) zur Verfügung gestellten Anti-hVEGF-Antikörper getestet. Mittels einer zweidimensionalen Titration wurde die Affinität der einzelnen Antikörper und die optimale Antikörperkonzentration geschätzt (Abb. 35).

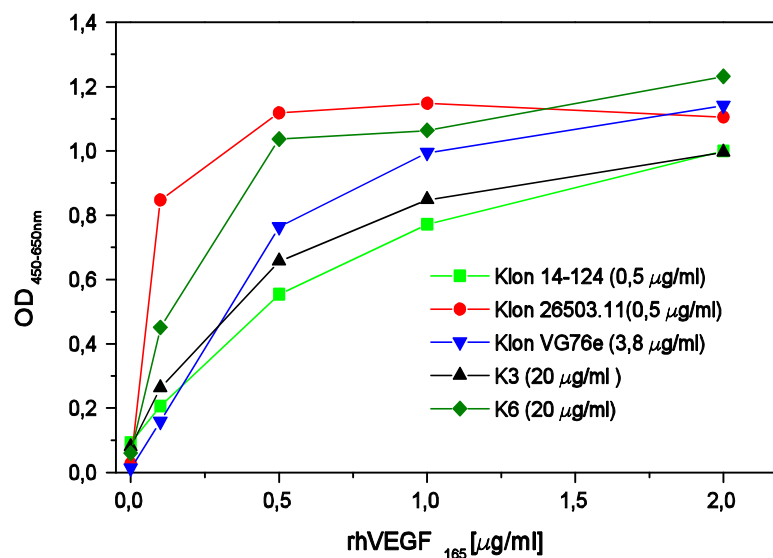


Abb. 35: Vergleich verschiedener Antikörper gegen rhVEGF₁₆₅. Der Nachweis des primären VEGF-Antikörpers erfolgte mit Hilfe eines POD-markierten-Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Antikörpers.

Da es sich bei allen verfügbaren Anti-hVEGF-Antikörpern um unmarkierte Proteine handelte, wurden sie mit Hilfe von sekundären Peroxidase-markierten-Anti-Maus- (SAM-POD) bzw. Anti-Kaninchen-Antikörpern (GAR-POD) (Kap. III.2.6.2, Tab. 6) nachgewiesen. Die Anti-hVEGF-Antikörper K6 und VG76e wurden mit Peroxidase gekoppelt (Kap. III.2.2.2) und ebenfalls getestet.

Das beste Ergebnis wurde mit der Kombination aus Anti-hVEGF-Antikörper Klon 26503.11 und SAM-POD erzielt. Um mit der Kombination K6 und GAR-POD ein ähnlich gutes Ergebnis erzielen zu können, mußte eine deutlich größere Antikörpermenge eingesetzt werden. Die polyklonalen Anti-VEGF-Antikörper K3 und K6, die im Rahmen einer Diplomarbeit an der Universität Freiburg von S. Selbert gegen das N-

terminale Ende des VEGF-Moleküls hergestellt worden waren (Selbert 1992), unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens zu VEGF. Auch die einzelnen K6- bzw. K3-Chargen verhalten sich unterschiedlich. Aufgrund dieser Heterogenität und der Tatsache, daß nur noch begrenzte Mengen K3 und K6 vorhanden waren, wurde beschlossen, auf die polyklonalen Kaninchen Antikörper K3 und K6 zu verzichten. Auch mit dem VG76e-POD-Konjugat wurden gute Ergebnisse erzielt.

Mit Hilfe der Kombination aus Klon 26503.11 und SAM-POD sowie dem VG76e-POD-Konjugat wurde versucht, einen Assay im Sandwichformat zum Nachweis von biologisch aktivem VEGF aufzubauen. Voraussetzung dafür war, daß die Antikörper und die löslichen Rezeptoren sKDR und sFLT-1 an unterschiedlichen Epitopen des Wachstumsfaktors binden. In Abbildung 36 ist deutlich zu sehen, daß die Kombination aus Anti-hVEGF-Antikörper und sekundärem Antikörper sowohl bei einer Beschichtung der Platte mit sFLT-1 als auch mit sKDR den Nachweis von VEGF ermöglichte.

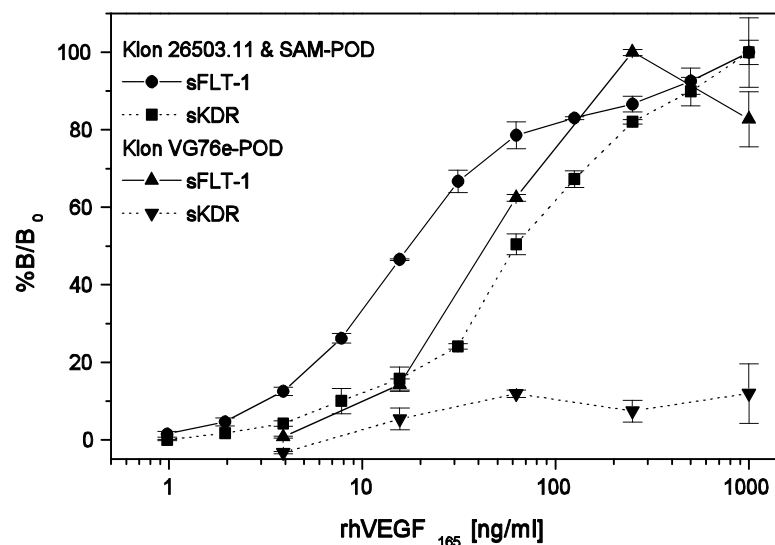


Abb. 36: Rezeptorassay zum Nachweis von rhVEGF₁₆₅ im Sandwichformat. Die VEGF-Verdünnungsreihen wurden in Mikrotiterplatten mit einer sFLT-1- bzw. sKDR-Beschichtung inkubiert (Kap. III.2.6.2). Anschließend wurde versucht das gebundene VEGF mit Hilfe Anti-hVEGF-Antikörper Klon 26503.11 und SAM-POD bzw. direkt mit dem VG76e-POD-Konjugat nachzuweisen.

Unter gleichen Bedingungen wurde im Rezeptorassay, basierend auf sFLT-1, mit dieser Antikörperkombination ein geringeres Detektionslimit und ein niedrigerer IC_{50} -Wert erreicht als mit dem markierten Anti-hVEGF-Antikörper VG76e. Mit dem VG76e-POD-Konjugat konnte an sFLT-1 gebundenes VEGF, aber nicht an sKDR gebundenes VEGF nachgewiesen werden.

Durch den Einsatz des VG76e-POD-Konjugates entfiel die Zugabe eines sekundären Antikörpers und somit verkürzte sich die Assaydauer von 6,5 auf 5,5 Stunden. In späteren Experimenten zeigte sich, daß das Konjugat bereits nach wenigen Wochen an Qualität verlor und zunehmend unspezifisch an der Plattenoberfläche gebunden wurde. Da keine ausreichend große Menge VG76e verfügbar war, konnte eine Versuchsreihe zur Optimierung und Stabilisierung des Konjugates nicht durchgeführt werden.

Von der Kopplung des Anti-hVEGF-Antikörper aus Klon 26503.11 wurde abgesehen, da die für eine Kopplung benötigten Mengen sehr teuer waren, und es zudem notwendig gewesen wäre, die Zusätze, die der Antikörperlösung zur Stabilisierung und Konservierung zugegeben waren, zu entfernen. Die Reinigung der Antikörperlösung wäre nur unter großem zeitlichen Aufwand und mit Verlust an Antikörpermenge möglich gewesen. Zudem wären bei der Reinigung und Kopplung des Antikörpers sowie der ggf. notwendigen Reinigung des Konjugates Aktivitätsverluste und somit eine geringere Sensitivität des Assays zu erwarten gewesen (Tijssen 1985).

Das beste Detektionslimit und der niedrigste IC_{50} -Wert wurden mit dem Anti-hVEGF-Antikörper Klon 26503.11 auf einer mit sFLT-1 beschichteten Platte erreicht. Bereits die Untersuchung der löslichen Rezeptorproteine und die Bestimmung ihrer K_D -Werte hatten gezeigt, daß sFLT-1 die höhere Affinität besitzt (Kap. IV.2.1). Die Affinität der einzelnen Bindungspartner bestimmt die Assayparameter. Nur mit Hilfe hochaffiner Rezeptorproteine und Antikörper konnten ein geringes Detektionslimit und ein niedriger IC_{50} -Wert erreicht werden. Daher wurde mit der Assayvariante basierend auf sFLT-1 und dem Nachweis des gebundenen Wachstumsfaktors mittels Anti-hVEGF-Antikörper Klon 26503.11 weitergearbeitet.

Nachdem eine geeignete Rezeptor-Antikörper-Kombination gefunden worden war, wurde versucht, das Detektionslimit, den IC_{50} -Wert und die Dauer des Assays zu optimieren. Auch die Spezifität wurde überprüft. Bei zwei spezifischen Bindungspartnern sollte diese allerdings kein Problem darstellen (Kap. II.1.2., R&D-Systems (b)). Die Spezifität des Assays wurde durch Inkubation von rhVEGF₁₆₅, rhVEGF₁₂₁, PlGF-2, EGF, IL-1, IL-2, bFGF und KGF geprüft. Nur bei rhVEGF₁₆₅ und rhVEGF₁₂₁ wurde eine konzentrationsabhängige Signalzunahme beobachtet. Bei allen anderen Wachstumsfaktoren lag das gemessene Signal unterhalb der Nachweisgrenze im Bereich des Hintergrundsignals. Da selbst PlGF-2, das eine 53 %ige Homologie zu VEGF besitzt (Park 1994) und an sFLT-1 bindet (Kap. IV.2.2), zu keinem meßbaren Signal führte, konnte davon ausgegangen werden, daß außer humanem VEGF keine weiteren Wachstumsfaktoren in diesem Assay erkannt werden. Spätere Untersuchungen mit murinem VEGF bestätigten diese Vermutung. Um rmVEGF₁₆₄ nachweisen zu können, mußte mit Anti-mVEGF-Antikörper gearbeitet werden. Ein Nachweis mit dem Anti-hVEGF-Antikörper Klon 26503.11 war nicht möglich.

Bei der Optimierung des Rezeptorassays wurde der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Assayparameter untersucht. Neben der Beschichtungsdichte (Abb. 37, 38) wurden auch die Temperatur und die Inkubationsdauer variiert. Zu Beginn der Arbeit wurden sowohl der Wachstumsfaktor als auch der Anti-hVEGF-Antikörper zwei Stunden inkubiert. Um die Gesamtdauer des Relidas zu senken, wurde untersucht, ob in beiden Fällen nicht auch eine Stunde Inkubationszeit ausreichend ist. Die Inkubationszeit des Antikörpers konnte problemlos um die Hälfte reduziert werden. Eine kürzere Inkubationszeit war bei VEGF möglich, aber nicht von Vorteil. Aufgrund größerer Schwankungen zwischen den einzelnen Meßwerten wurde die Auswertung erschwert und das Detektionslimit zu höheren Werten hin verschoben. Der Einfluß der Temperatur auf den Assay war gering. Bei parallel durchgeführten Experimenten erfolgte die Inkubation von VEGF und der Antikörper bei RT bzw. 37 °C. Die Standardkurve der höheren Temperatur lag ca. 5 - 15 % unterhalb der Kurve bei Raumtemperatur.

Betrachtet man Abbildung 37, so wird deutlich, daß der Verlauf der VEGF-Standardreihen sowohl von der Konzentration der Rezeptorlösung als auch vom Volumen pro Kavität beeinflußt wurde. Der IC_{50} -Wert der Kurven verschob sich bei abnehmender Rezeptormenge nur geringfügig von 7,7 über 8 zu 11,4 ng/ml. Das Detektionslimit änderte sich nicht, da bei geringerer Rezeptordichte neben dem OD-Wert für 390 pg/ml auch das Signal für den Nullwert abnahm. Allerdings war die Standardkurve, die auf einer mit 1 µg/ml sFLT-1 beschichteten Platte aufgenommen wurde, aufgrund des Kurvenverlaufes bzw. der größeren Steigung und höheren Signale zur Analyse von Realproben besser geeignet.

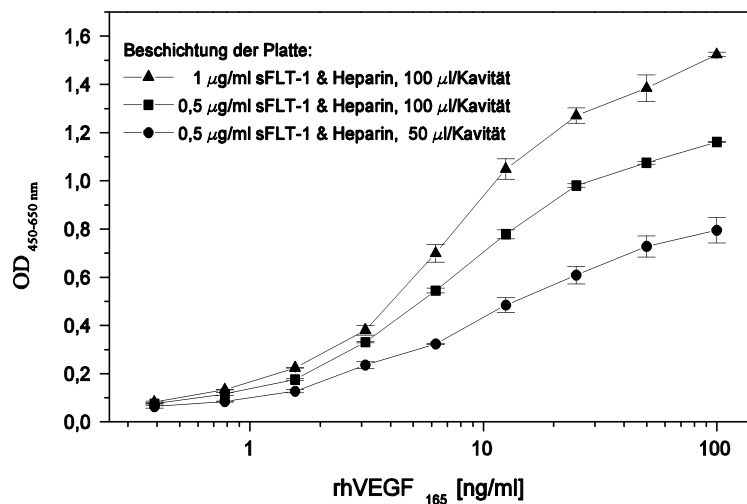


Abb. 37: Nachweis von rhVEGF₁₆₅ auf einer mit unterschiedlichen Rezeptormengen beschichteten Mikrotiterplatte. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-hVEGF-Antikörper (Klon 26503.11) und SAM-POD.

Bei der Erhöhung der Rezeptorkonzentration auf 2 µg/ml konnte ein interessanter Effekt beobachtet werden (Abb. 38). Bei höheren VEGF-Konzentrationen verlief Kurve I erwartungsgemäß oberhalb von Kurve II. Zu niedrigeren Konzentrationen hin näherten sich die Kurven an und kreuzten sich immer im Bereich zwischen 3 und 12 ng/ml. Im unteren Konzentrationsbereich der Standardreihe lagen somit die gemessenen OD-Werte der Kurve I, trotz höherer Beschichtungsdichte, unterhalb derer der Kurve II. Das Detektionslimit des Assays erhöhte sich bei der höheren sFLT-1-Beschichtungsdichte.

Erklären ließe sich dieser Effekt dadurch, daß bei einer höheren Beschichtungsdichte die Wahrscheinlichkeit stieg, daß sich einige Rezeptormoleküle in ausreichender Nähe zueinander befanden, so daß ein VEGF-Molekül gleichzeitig an zwei Rezeptormoleküle binden konnte. Vermutlich wurde bei der Bindung von VEGF an zwei Rezeptoren die Bindungsstelle für den Antikörper verdeckt. So gebundenes VEGF könnte dann nicht nachgewiesen werden.

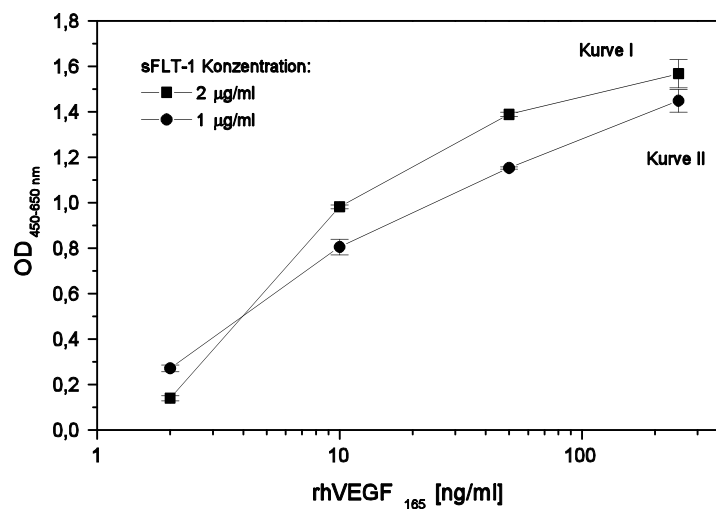


Abb. 38: Einfluß der Beschichtungsdichte auf den Assay.

Die Vermutung, daß sich das Bindungsverhältnis in Abhängigkeit von der Rezeptordichte verändert, wurde durch BIAcore Messungen unterstützt (Kap. IV.2.1.3). Hier wurde beobachtet, daß bei steigender Rezeptorkonzentration auf der Sensoroberfläche zwar die Menge an gebundenen VEGF stieg, jedoch nicht entsprechend der immobilisierten Rezeptormenge. Die Berechnung der Bindungsverhältnisse zeigte eine Verschiebung des Verhältnisses von Rezeptor und VEGF bei steigender Rezeptordichte auf der Oberfläche von 1 : 1 zu 1 : 2.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle weiteren Versuche die Mikrotiterplatten mit 1 µg/ml sFLT-1 und der gleichen Menge Heparin beschichtet. Auf die Bedeutung von Heparin und die dazu gehörigen Untersuchungen wird später im Zusammenhang mit den Stabilitätstests der beschichteten Platten eingegangen.

Murines VEGF₁₆₄ und humanes VEGF₁₆₅ verhalten sich sehr ähnlich (Shima 1996, Ferrara 1996). Mit Hilfe von Mäusen werden in der Wissenschaft oft Signalwege, Krankheiten und die Wirkung verschiedener Substanzen erforscht. Für diese Mausmodelle wird rmVEGF₁₆₄ benötigt. Um die Qualität des rekombinant hergestellten Materials zu prüfen, wurde ein mVEGF₁₆₄-spezifischer Assay benötigt. Als ein Antikörper gegen murines VEGF₁₆₄ (Anti-mVEGF) kommerziell zur Verfügung stand, wurde mit ihm, in Anlehnung an den Relida für humanes VEGF₁₆₅, ein Assay für den Nachweis von rmVEGF₁₆₄ aufgebaut.

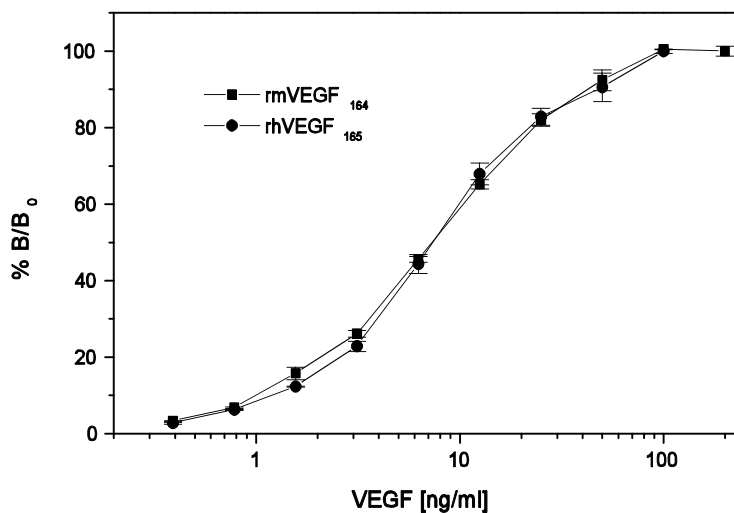


Abb. 39: Nachweis von rhVEGF₁₆₅ bzw. rmVEGF₁₆₄ mit dem entsprechend optimierten Relida. Die Durchführung der Assays wird in Kapitel II.2.6.2 beschrieben.

In Abbildung 39 sind die charakteristischen Standardkurven für den Nachweis von rmVEGF₁₆₄ und rhVEGF₁₆₅ dargestellt. Die dazu gehörigen Assayparameter sind in Tabelle 13 aufgelistet. Beide Messungen wurden nach dem in Kapitel III.2.6.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt, das anschließend für die Bestimmung von Zellkulturüberständen genutzt wurde (Kap. IV.3.4). In Abhängigkeit von der verwendeten Rezeptorcharge kam es zu geringfügigen Schwankungen bei allen Parametern. Ein ausführlicher Vergleich der Relidas im Sandwichformat folgt zusammen mit dem kompetitiven und dem im BIAcore entwickelten Rezeptorassay in Kapitel IV.3.3.

Tab. 13: Parameter der in Abbildung 39 dargestellten Standardkurven

	rmVEGF ₁₆₄	rhVEGF ₁₆₅
IC ₅₀ -Wert [ng/ml]	9	9
Detektionslimit [pg/ml]	390	390
linearer Bereich [ng/ml]	3 - 25	3 - 25
Standardabweichung [%]	3	3

Im Laufe der Experimente zeigte sich, daß die Qualität des Assays nicht nur von den bisher genannten Parametern, wie z.B. Wahl des Antikörpers oder Rezeptordichte, abhing, sondern auch von der gewählten Rezeptorcharge. Daß die einzelnen Rezeptorchargen bezüglich ihrer Affinität zu VEGF variierten, wurde bei den radioaktiven Vergleichsmessungen ebenfalls festgestellt (Kap. IV.2.3.1). Die unterschiedliche Qualität der Rezeptorchargen äußerte sich in Schwankungen des IC₅₀-Wertes, des linearen Bereiches und des Detektionslimits (Kap. IV.3.3). So konnte z.B. der lineare Bereich des Relidas zum Nachweis von rhVEGF₁₆₅ bei 1 bis 3 ng/ml beginnen und bei 25 bis 100 ng/ml enden. Um dieses Problem zu minimieren, wurden die löslichen Rezeptorproteine nach ihrer Aufreinigung in einem radioaktiven Assay getestet und nur hochaktive Chargen im Relida verwendet (Kap. III.2.6.1, IV.2.3.1).

Auch mehrfaches Auftauen und Einfrieren der löslichen Rezeptoren führte zu einem Aktivitätsverlust. Um dieses zu vermeiden und einen Vorrat an beschichteten Platten zu haben, wurde untersucht, ob sich die mit sFLT-1 beschichteten Platten ohne größere Verluste lagern lassen. Auch für eine Kommerzialisierung des Assays ist die Stabilität der Rezeptoren wichtig. Da der Assay möglichst einfach und ohne große Vorbereitungen schnell durchzuführen sein sollte, ist es notwendig, bereits beschichtete und blockierte Platten zu verschicken. Weder beim Transport noch bei der anschließenden evtl. einige Wochen dauernden Lagerung dürfen die immobilisierten Rezeptorproteine an Aktivität verlieren.

Im Zusammenhang mit der Lagerstabilität des immobilisierten Rezeptors wird auch auf die Bedeutung von Heparin für die Mikrotiterplattenassays eingegangen. Daß Heparin die Bindung von VEGF an KDR und FLT-1 positiv beeinflusst, ist schon seit längerem bekannt (Gita-Goren 1992, Terman 1994, Tessler 1994), wobei die Affinität von KDR eine stärkere Heparinabhängigkeit zeigt. Allerdings kann Heparin auch die Bindung von VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ an FLT-1-tragende-Melanoma-Zellen inhibieren. (Terman 1994). Der Einfluß der Heparinkonzentration auf die Aktivität der löslichen Rezeptoren sFLT-1 und sKDR wurde von W. Roeckl untersucht (Roeckl 1998). Er stellte fest, daß, wie erwartet, sKDR eine deutlich größere Heparinabhängigkeit zeigt als sFLT-1 (Kap. II.1.2). In Gegenwart von Heparin konnte bis zu 25 % mehr rhVEGF₁₆₅ an sFLT-1 gebunden werden. Bei der Erhöhung der Heparinkonzentration über die von sFLT-1 hinaus beobachtete er eine Abnahme der Affinität.

Bereits zu Beginn dieser Arbeit wurde die Rolle, die Heparin bei der Entwicklung eines Assays, basierend auf sFLT-1, spielen könnte, untersucht. Sowohl in radioaktiven Experimenten als auch bei der Optimierung der Relidaformate wurde festgestellt, daß Heparin für die Entwicklung eines sensitiven Assays notwendig war. Der Einfluß, den Heparin auf das Detektionslimit, den IC₅₀-Wert und Stabilität hatte, ist in Abbildung 40 zu sehen.

Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden einige Mikrotiterplatten, wie in Kapitel III.2.6.2 beschrieben, beschichtet und blockiert. Ein Teil von ihnen wurde lyophilisiert und eingeschweißt bei 4°C gelagert. Der andere Teil wurde nach dem Blockschrift mit 200 µl Blockpuffer pro Kavität bei -20°C eingefroren. Nach einer Woche wurden die Platten aufgetaut bzw. rekonstituiert und zusammen mit einer neu beschichteten Referenzplatte vermessen. Bei Betrachtung der Standardkurven wird sichtbar, daß die in Gegenwart von Heparin beschichteten sFLT-1-Rezeptoren in allen Varianten mehr VEGF binden konnten und somit zu einem sensitiveren Assay führten. Zudem hatte sich die Anwesenheit von Heparin positiv auf die Stabilität ausgewirkt. Unabhängig von der Art der Lagerung lagen die Standardkurven der mit sFLT-1 und Heparin beschichteten

Platte eng zusammen. Die Lagerung hatte die Aktivität der immobilisierten Rezeptorproteine nicht beeinflusst. Ohne Heparin dagegen unterschieden sich die Kurven deutlich.

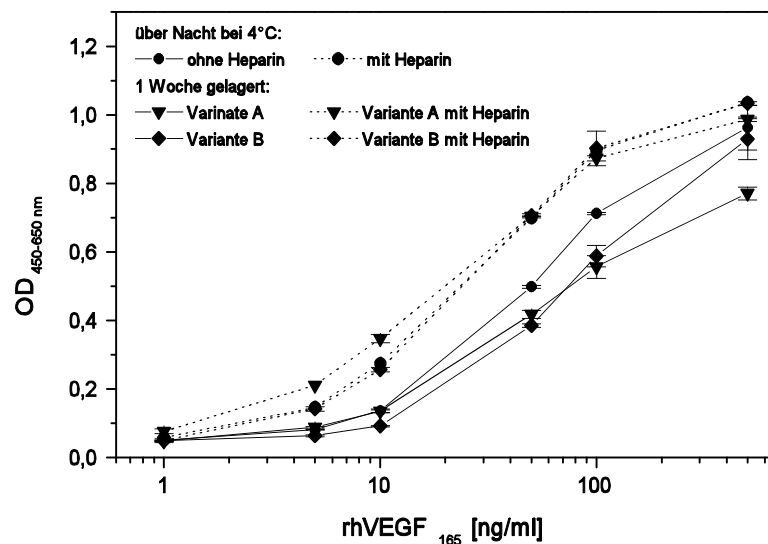


Abb. 40: Einfluß von Heparin auf die Lagerstabilität der immobilisierten sFLT-1 Proteine. Einige Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/ml sFLT-1 und 1 µg/ml Heparin bzw. ohne Heparin über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten blockiert und anschließend die Hälfte der Platten mit vollen Kavitäten eingefroren und bei -20°C gelagert (Variante B). Die anderen wurden lyophilisiert, eingeschweißt und bei 4°C gelagert (Variante A). Als Vergleich diente eine über Nacht bei 4°C beschichtete Platte. Für alle Experimente wurde dieselbe Rezeptorcharge verwendet.

Weitere Lagerungsexperimente (Abb. 41) zeigten, daß die in Gegenwart von Heparin beschichteten und lyophilisierten sFLT-1-Rezeptoren auch nach einer zweiwöchigen Lagerung bei 4°C noch ihre volle Aktivität besaßen. Eine der beschichteten Platten wurde nach zwei Wochen bei 4°C nochmals für 24 Stunden bei 37°C temperiert. Auch hier konnten keine großen Verluste beobachtet werden. Laut Desphande entspricht eine Inkubation von einem Tag bei 37 °C ungefähr einer Lagerung von 1 bis 2 Monaten bei 4°C (Desphande 1996). Eine längere Lagerung beschichteter und lyophilisierter Platten bei 4°C oder -20°C sollte demnach möglich sein. Aus zeitlichen Gründen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Stabilitätstests durchgeführt werden.

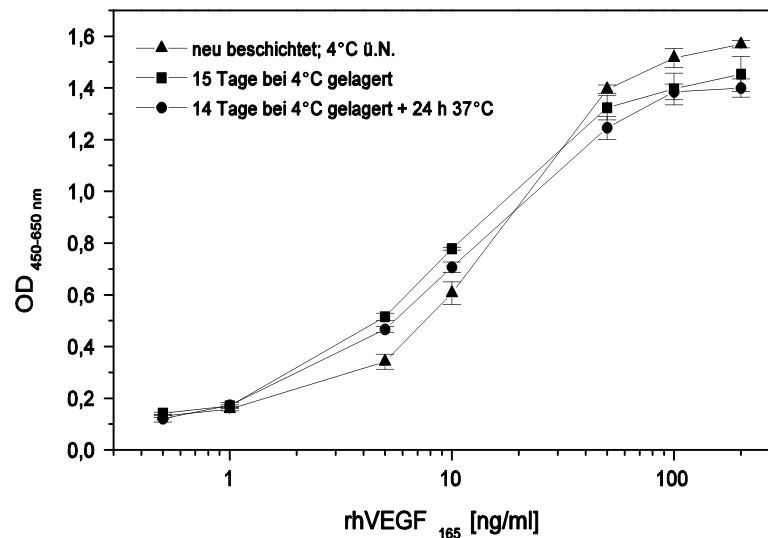


Abb. 41: Lagerstabilität des immobilisierten und lyophilisierten sFLT-1-Rezeptors. Nach dem Blockieren wurden die mit sFLT-1 und Heparin beschichteten Platten lyophilisiert, eingeschweißt und gelagert.

Während die VEGF-Konzentration in Zellkulturproben normalerweise im $\mu\text{g/ml}$ Bereich liegt, findet man in humanen Proben in Abhängigkeit von der Krankheit VEGF nur im pg/ml bzw. unteren ng/ml Bereich (Baker 1995, Konno 1998, Samaniego 1998). Bei einem gesunden Menschen findet man ungefähr 42 pg/ml hVEGF₁₆₅ (Rodriguez 1998).

Um Proben mit so geringer VEGF-Konzentration untersuchen zu können, mußte das Signal, das durch die Bindung jedes einzelnen VEGF-Moleküls entstand, verstärkt werden. Möglich ist eine Signalverstärkung z.B. mit Hilfe von Polyperoxidase-Antikörper-Konjugaten oder mehrfach biotinylierten Antikörpern, die mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen werden. In beiden Fällen werden an den Analyten über den Antikörper mehrere Peroxidasereste gebunden. Daraus ergibt sich, daß mehr Substrat umgesetzt und das Signal pro gebundenes Molekül verstärkt wird.

Um eine maximale Signalverstärkung zu erhalten, wurde sowohl mit dem Biotin-Streptavidin-System als auch mit der Polyperoxidase gearbeitet. Statt wie bisher mit einem Anti-hVEGF-Antikörper und einem sekundären Peroxidase-markierten-Antikör-

per wurde gebundenes VEGF mit einem biotinylierten Anti-hVEGF-Antikörper (Anti-hVEGF-Biotin) und einem Polyperoxidase-Streptavidin-Konjugat (SA-POD) nachgewiesen. Bei den ersten Experimenten mit dieser Kombination war das Hintergrundsignal relativ hoch. Durch den Zusatz von NaCl und Casein bzw. die Verwendung von HPE-Puffer konnte dieser Effekt beseitigt werden. Vergleicht man den Nachweis von rhVEGF₁₆₅ mit der bisherigen Kombination von Anti-hVEGF und SAM-POD und der neuen Kombination aus Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD, sieht man, daß das Detektionslimit und der IC₅₀-Wert des Assays deutlich verbessert werden konnten (Abb. 42).

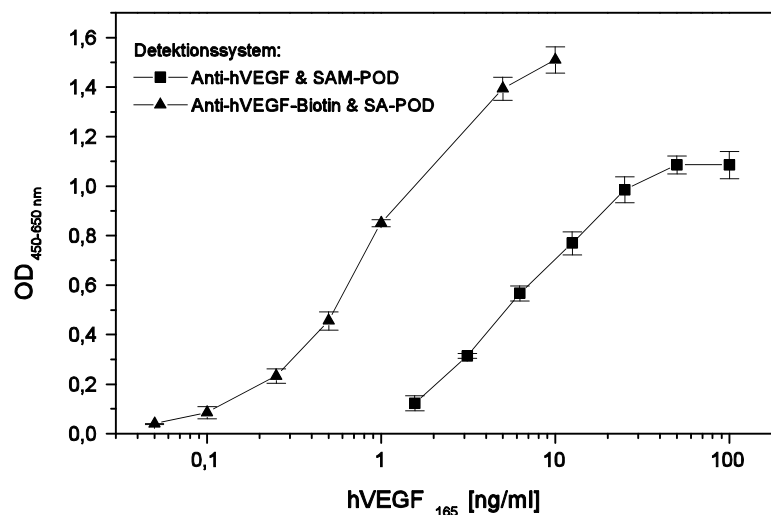


Abb. 42: Einfluß des Detektionssystems. rhVEGF₁₆₅ wurde mit Hilfe von Anti-hVEGF und SAM-POD bzw. mit Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD nachgewiesen.

Bei der Standardkurve 1, lag der IC₅₀-Wert bei 6,7 ng/ml und der lineare Bereich reichte von 1,5 bis 50 ng/ml. Bei der zweiten Kurve wurde ein IC₅₀-Wert von 1,4 ng/ml erreicht und der lineare Bereich lag bei 250 pg/ml bis 5 ng/ml.

Bisher wurde mit TMB und H₂O₂ ein kolorimetrisches Peroxidasesubstrat zur Detektion verwendet. Durch den Einsatz des BM-Chemilumineszenz-ELISA-Reagenz (Boehringer, Mannheim), bestehend aus Luminol und dem Enhancer 4-Iodophenol, konnte das Detektionslimit und der Konzentrationsbereich des Assays verbessert werden (Kap. III.

2.6.4). Mit dem Chemilumineszenz-Relida konnten VEGF-Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 100 ng/ml bestimmt werden (Abb. 43).

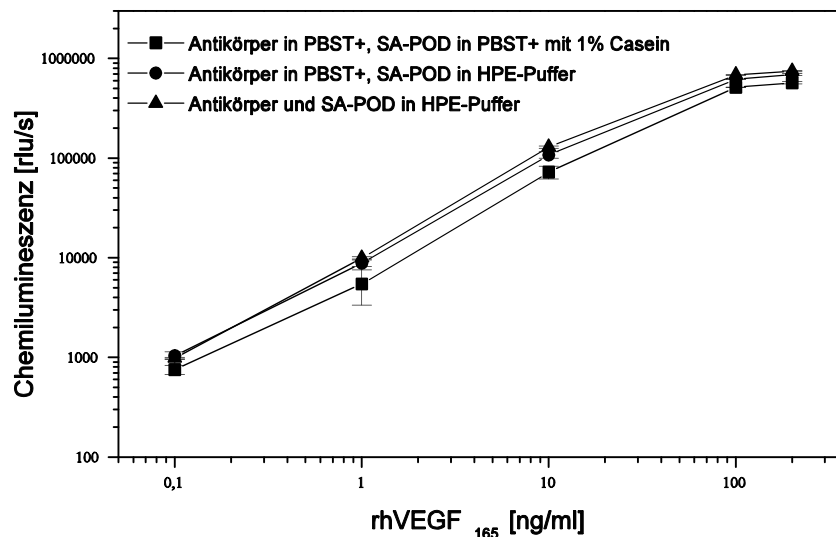


Abb. 43: Nachweis von rhVEGF₁₆₅ mit Hilfe von Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD. Die Detektion erfolgte mit dem BM-Chemilumineszenz-ELISA-Reagenz (Kap. III.2.6.4). Die Chemilumineszenz wird in relative Lichteinheiten (relative light units, rlu) pro Sekunde angegeben.

Die Kombination aus Anti-hVEGF-Biotin, SA-POD und Chemilumineszenz-Substrat hatte den Vorteil, daß mit dieser Kombination sehr geringe VEGF-Mengen bestimmt werden konnten. Für die Bestimmung von VEGF in Zellkulturüberständen war es jedoch nicht notwendig Mengen unter 1 ng/ml nachzuweisen.

Zusätzlich war dieses Assayformat aufgrund der Kombination Anti-hVEGF-Biotin und SA-POD und der Verwendung des kommerziellen Chemilumineszenz-Substrates relativ teuer. Da der VEGF-Nachweis mit Anti-hVEGF und SAM-POD bzw. Anti-mVEGF und GAR-POD einerseits günstiger und andererseits sehr gut geeignet war für die quantitative Bestimmung von VEGF in Zellkulturproben, sollte dieses Format weiterhin dafür genutzt werden. Der Chemilumineszenz-Relida sollte nur für die Bestimmung von humanen Proben eingesetzt werden.

3.2 Messungen mit dem BIAcore-System - einem optischen Affinitätssensor

Mit Hilfe des BIAcore-Systems wurde das Bindungsverhalten der sFLT-1 Rezeptorproteine und ihrer Liganden rhVEGF₁₆₅ untersucht und eine Methode zum quantitativen Nachweis von rhVEGF₁₆₅ und rmVEGF₁₆₄ entwickelt (Kap. IV.2.1).

Im Gegensatz zu den Mikrotiterplattenassays wurden auf der Sensoroberfläche nur die löslichen Rezeptorproteine immobilisiert. Aufgrund seiner negativen Ladung und ungeeigneter funktioneller Gruppen konnte Heparin nicht auf der Oberfläche fixiert werden. Der Versuch, statt dessen Heparin zusammen mit dem Wachstumsfaktor über den Sensor zu leiten, führte zu keiner Veränderung bzw. bei sehr hohen Heparinkonzentrationen zu einer Signalabnahme. Erklären ließe sich dieser Effekt durch die Anlagerung von Heparin an rhVEGF₁₆₅. Die negative Ladung des Heparins verhinderte, daß ein Teil der VEGF-Moleküle in die Nähe der Oberfläche, somit der Rezeptoren gelangen konnte. Da die Affinität von sKDR stark von Heparin abhängt (Roeckl 1998), konnten nur sehr geringe VEGF-Anlagerungen beobachtet werden, wenn sKDR auf der Sensoroberfläche immobilisiert war. Hinzu kam, daß die Affinitätskonstante der monomeren sKDR-Proteine, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde, auch in Gegenwart von Heparin nur 8 nM betrug (Kap. IV.2.1). Kinetische Untersuchungen und eine Assayentwicklung waren auf dieser Basis nicht möglich. Aufgrund der größeren Affinität und des geringeren Heparineinflusses, konnten Messungen, basierend auf sFLT-1, durchgeführt werden.

Für kinetische Untersuchungen und quantitative Nachweismethoden waren jeweils andere Rezeptordichten sowie Inkubationsdauern auf der Sensorfläche notwendig (Kap. III.2.7). In beiden Fällen mußten jedoch systembedingte Probleme berücksichtigt werden. So erfassen SPR-Sensoren alle Änderungen der optischen Eigenschaften, unabhängig davon, ob es sich um eine spezifische oder unspezifische Anlagerung oder einen Pufferwechsel handelt. Bei der Untersuchung von Realproben mußte sichergestellt werden, daß das erhaltene Signal auf der Bindung von VEGF an sFLT-1 basierte und nicht die Folge einer unspezifischen Anlagerung anderer Substanzen bzw. Proteine

aus der Probe an die Sensoroberfläche waren. Daher wurde die erste der vier Fließzellen als Referenz genutzt. Ihre Oberfläche wurde zusammen mit denen der anderen Fließzellen aktiviert und deaktiviert, ohne Rezeptoren zu immobilisieren.

Ebenfalls kritisch war die Stabilität der verwendeten Rezeptorproteine. In den Mikrotiterplattenassays wurde VEGF nur einmal an die Rezeptoren gebunden. Im BIAcore-System mußten die immobilisierten Rezeptorproteine sowohl die in einem Fließsystem wirkenden Kräfte aushalten, als auch ein mehrfaches Regenerieren und Binden des Wachstumsfaktors ermöglichen. Um die einzelnen Messungen miteinander vergleichen zu können, mußte die Sensoroberfläche bei jeder Anlagerung annähernd gleich sein, d.h. es sollten keine Aktivitätsverluste bei den Rezeptoren auftreten. Die zur Regeneration verwendeten Lösungen mußten ausreichend stark sein um die Bindung zu lösen, durften aber nicht den Rezeptor zu sehr beschädigen. Als geeignet erwies sich, im Wechsel 5 mM NaOH und 10 mM HCl über die Sensoroberfläche zu leiten (Kap. III.2.7.2). Bei der Bestimmung von Zellkulturüberständen wurde ein zusätzlicher Spülschritt mit 1 M NaCl vor der Regeneration eingefügt, da sich in den Proben neben VEGF und anderen Proteinen zusätzlich Zellreste und Lipide befanden. Ohne den NaCl-Spülschritt kam es bei der ersten NaOH Injektion aufgrund von pH-Wertverschiebung zu Ausfällungen, die das Fließsystem verstopften.

Die Stabilität der Rezeptoren wurde getestet, indem mehrfach die gleiche VEGF-Menge angelagert, die Bindungsstelle regeneriert und die Änderung der Signalthöhe nach der Anlagerung beobachtet wurde. Bei einer immobilisierten Rezeptormenge von 1000 RU verursachten die ersten 10 Regenerationen keine Verluste. Nach 60 Regenerationsschritten betrug der Aktivitätsverlust ca. 20 %. Um Effekte zu erfassen, die auf Aktivitätsverlusten basieren, wurde die Standardreihe zu Beginn und Ende einer Untersuchungsreihe oder Realprobenbestimmung vermessen.

Nachdem die Stabilität der Rezeptoren getestet und eine geeignete Regenerationsmethode gefunden war, wurde die sFLT-1-VEGF-Bindung hinsichtlich ihrer Kinetik untersucht und mit dem Aufbau eines quantitativen Assays begonnen (Kap. IV.2.1).

3.2.1 Rezeptorassay basierend auf einem optischen Affinitätssensor

Nach der Kopplung der löslichen Rezeptorproteine auf der Sensoroberfläche wurden verschiedene VEGF-Konzentrationen über den Sensor geleitet und die Anlagerung beobachtet (Abb. 44). Das Erreichen der Gleichgewichtsphase war für die quantitative Auswertung der Anlagerung nicht notwendig. Ausgewertet wurde die Differenz der Signalthöhe zwischen der Basislinie vor der Anlagerung und einige Sekunden nach Ende der Probeninjektion (Abb. 44). Die Differenzen der einzelnen Anlagerungen wurden über die VEGF-Konzentration aufgetragen (Abb. 45).

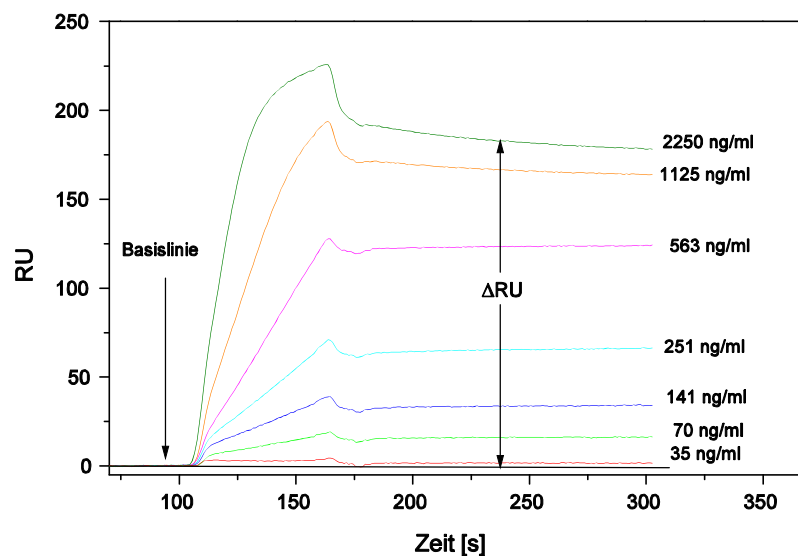


Abb. 44: Anlagerung verschiedener rhVEGF₁₆₅-Konzentrationen an eine Sensoroberfläche auf der 1030 RU sFLT-1 immobilisiert waren. Die Differenz der Signalthöhe ΔRU zwischen der Basislinie und der angelagerten VEGF-Menge wurde bestimmt und als Standardreihe aufgetragen (Abb. 45).

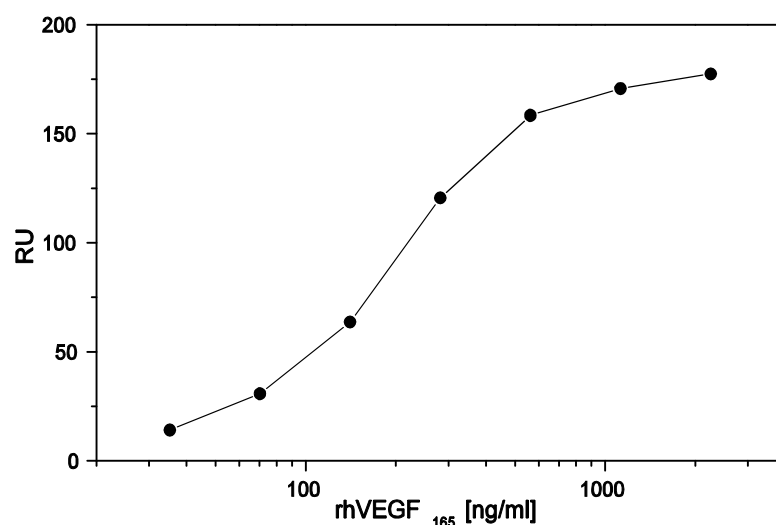


Abb. 45: Darstellung einer rhVEGF₁₆₅-Standardreihe, die aus den in Abbildung 44 gezeigten Daten erstellt wurde.

Mit Hilfe der erhaltenen Standardreihe wurde der Meßbereich des Rezeptorassays unter den jeweiligen Versuchsbedingungen bestimmt. Vor allem die immobilisierte sFLT-1-Menge und das injizierte Probenvolumen beeinflussen die Assayparameter (Tab. 14). Eine Signaländerung um 1000 RU entspricht einer Kopplung von 1 ng Protein pro mm² (Kap. II.4.2.2.1)

Tab. 14: Einfluß der immobilisierten Rezeptormenge und des Probenvolumens

sFLT-1 [ng/mm ²]	Probenvo- lumen [µl]	IC ₅₀ -Wert [ng/ml]	linearer Bereich [ng/ml]	Detektions- limit [ng/ml]	Fehler [%]
1,03	5	280 - 350	68 - 563	35	3 - 12
1,83	5	882	270 - 2250	68	4 - 12
1,83	20	279	135 - 1125	35	4 - 12
4,9	5	711	180 - 1400	44	5 - 15
5	20	275	90 - 675	22	5 - 15

Bei gleicher Rezeptordichte auf der Sensoroberfläche verschob sich mit größeren Probenvolumina der lineare Bereich, der IC_{50} -Wert und das Detektionslimit zu niedrigeren Werten. Die Injektion eines größeren Probenvolumens führte bei gleicher Fließrate zu einer längeren Kontaktzeit der Probe mit der Sensoroberfläche und somit zur Anlagerung einer größeren VEGF-Menge. Deshalb wurde schon bei geringeren Wachstumsfaktorkonzentrationen ein auswertbares Signal erhalten. Das Detektionslimit und die untere Grenze des linearen Bereiches wurden gesenkt. Die vorhandenen Bindungsplätze waren bereits bei niedrigeren Konzentrationen belegt und die Sättigung erreicht. Dadurch wurde der linearer Bereich nicht nur zu kleineren Konzentrationen verschoben, sondern auch verkleinert. Die Injektion einer größeren Probenmenge verlängerte die Meßdauer pro Zyklus um drei Minuten. Bei sieben bis neun verschiedenen Konzentrationen pro Standardreihe, mehreren Verdünnungen einer Probe und einer Doppelbestimmung aller Werte verlängerte sich die Meßdauer in Abhängigkeit von den Probenzahl um ein bis zwei Stunden.

Mit steigender sFLT-1-Dichte auf der Sensoroberfläche wurde zunächst eine Abnahme des Detektionslimits und ein Anstieg des IC_{50} -Wertes beobachtet (Tab. 14). Bei der weiteren Erhöhung der Beschichtungsdichte von 1,83 auf 4,9 ng/mm² konnte keine weitere Veränderung erreicht werden.

Schon bei einer sehr geringen Beschichtungsdichte von 0,34 ng/mm² wurde ein Bindungsverhältnis von zwei Rezeptorproteinen zu einem VEGF-Molekül errechnet (Tab. 9, Kap. IV.2.1.2). Damit ein VEGF-Molekül von zwei löslichen Rezeptoren gebunden werden konnte, mußten sich diese in ausreichender Nähe zueinander befinden. Bei einer hohen Rezeptordichte auf der Oberfläche des Sensors wurde der optimale Abstand für die Bindung von VEGF an zwei Rezeptoren unterschritten. Befanden sich mehrere Rezeptoren in ausreichender Nähe zueinander, so wurde nach der Bindung eines VEGF-Moleküls die Anlagerung weiterer Wachstumsfaktoren erschwert. Bei den höheren Beschichtungsdichten kam es verstärkt zu sterischen Hinderungen.

Mit einer Beschichtung von ca. 1 ng löslicher Rezeptoren pro mm² wurde die besten Ergebnisse erzielt. Aus diesem Grund wurden für die Realprobenbestimmung ca. 1000 RU sFLT-1 auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Um Probemenge und Zeit zu sparen

wurde ein Volumen von 5 μ l injiziert. Sowohl die Standardreihe als auch alle Proben wurden doppelt bestimmt (Kap. IV.3.4).

Mit Hilfe eines weiteren optischen Affinitätssensors, dem Gitterkoppler (Polzius 1995), wurde ebenfalls versucht, einen Assay für den Nachweis von VEGF aufzubauen. Aufgrund der großen Proteinmengen, die für eine Messung benötigt wurden, der Tatsache, daß es sich um ein Einkanalgerät handelte, und Problemen, die bei der Regeneration sowie der Stabilität der Oberfläche auftraten, war es nicht möglich den Gitterkoppler zu nutzen.

3.3 Vergleich der verschiedenen Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene indirekte sowie ein direkter labelfreier Rezeptorassay für den Nachweis von biologisch aktivem VEGF entwickelt. In diesem Kapitel werden die für die Bestimmung von VEGF in Zellkulturüberständen genutzten Formate verglichen. Die verwendeten Formate basierten auf dem löslichen Rezeptorprotein sFLT-1 und nicht auf sKDR. Bei den indirekten Rezeptorassays auf Mikrotiterplattenbasis handelte es sich um ein Sandwich- und ein kompetitives Format. Das Sandwichformat wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern entwickelt, um sowohl murines als auch humanes VEGF nachweisen zu können. Da im kompetitiven Assay genau wie im direkten Rezeptorassay, der auf dem BIAcore-System basierte, ohne Antikörper gearbeitet wurde, war bei diesen Formaten diese Modifikation nicht notwendig. Das kompetitive Assayformat wurde von M. Johanson optimiert. Die zum Vergleich der Methoden herangezogenen Daten wurden ihrer Diplomarbeit entnommen (Johanson 1999). Das Detektionslimit und der IC_{50} -Wert des kompetitiven Assays wurden stark durch die Vorinkubation der Proben beeinflusst. Zunächst wurden die Proben für einige Minuten auf der beschichteten Platte inkubiert. Danach wurde das VEGF-POD-Konjugat zu den Proben gegeben und die beiden Komponenten zusammen für ein bis zwei Stunden weiter inkubiert (Johansson 1999). Meist erfolgte die Be-

stimmung der Realproben nach dem Standardprotokoll ohne Vorinkubation, d.h. die Proben und das VEGF-POD-Konjugat wurden direkt zusammen inkubiert. Durch die Vorinkubation der Proben konnte das Detektionslimit gesenkt und somit geringer konzentrierte Proben bestimmt werden. Das beste Ergebnis wurde durch eine 20-minütige Vorinkubation der Proben erzielt. In Tabelle 15 sind die IC_{50} -Werte, das Detektionslimit und die Standardabweichungen der verschiedenen Formate dargestellt.

Tab. 15: Vergleich der verschiedenen Rezeptorassayformate basierend auf sFLT-1

Format	IC_{50} -Wert [ng/ml]	Detektionslimit [ng/ml]	Fehler [%]
kompetitiv - Standardprotokoll	200 - 300	40 - 60	5
- mit Vorinkubation	30	2	5
Sandwich (mVEGF ₁₆₄)	4 - 18	0,39 - 0,78	3
Sandwich (hVEGF ₁₆₅)	7 - 20	0,39 - 0,78	3
direkt im BIAcore	280 - 350	35	12

Mit IC_{50} -Werten zwischen 4 und 18 bzw. 7 und 20 ng/ml und einem Detektionslimit unter 1 ng/ml wurde mit den Rezeptorassay im Sandwichformat das beste Ergebnis erreicht. Durch den Einsatz eines biotinylierten Anti-VEGF-Antikörpers und eines Streptavidin-Konjugates mit mehreren Peroxidaseresten konnte das Sandwichformat weiter verbessert werden (Kap. IV.3.1.2). Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, in Zukunft auch humane Realproben zu untersuchen, die eine hVEGF₁₆₅-Konzentration zwischen 200 pg/ml und 3 ng/ml aufweisen.

Die Nachweisgrenze des kompetitiven Assays und des Rezeptorassays im BIAcore-System war höher als die des Sandwichassays, aber ausreichend um den VEGF-Gehalt der meisten Zellkulturüberstände bestimmen zu können (Kap. IV.3.4). Von Vorteil war bei diesen beiden Formaten, daß keine Modifikation des Assays notwendig war, um humanes oder murines VEGF nachzuweisen. Das antikörperfreie Arbeiten in diesen

Formaten vereinfacht die Suche nach VEGF-Analoga, anderen Substanzen, die an den Rezeptoren binden können, und Inhibitoren der VEGF-sFLT-1 bzw. sKDR- Bindung. Im Sandwichassay kann das Ausbleiben eines Signals sowohl keine Bindung an den Rezeptor als auch keine Erkennung des gebundenen Proteins durch den verwendeten Antikörper bedeuten. Die Anlagerung einer Substanz bzw. eines Proteins an die Bindungsstelle der Rezeptoren kann im BIAcore-System direkt und im kompetitiven Relida über die Verdrängung des VEGF-POD-Konjugates bestimmt werden.

Auch in der Assaydauer variierten die einzelnen Formate. Während für den kompetitiven Relida 3,5 Stunden und für den Relida im Sandwichformat 5,5 Stunden bei einer Zahl von 25 Proben, die inklusive einer Standardreihe simultan vermessen werden können, benötigt wurden, dauerte im BIAcore-System ein Zyklus, bestehend aus Anlagerung und Regeneration, 30 Minuten. 20 Minuten davon waren Spülzeit nach dem letzten Regenerationsschritt, bis der von der Natronlauge verursachte, Matrixeffekt beseitigt und eine stabile Basislinie erreicht war. Daher war die parallele Bestimmung vieler Proben z.B. nach Abschluß der Fermentation war mit den Mikrotiterplattenassays schneller durchzuführen. Werden aber nur einzelne Proben z.B. während einer Fermentation auf aktives VEGF untersucht oder soll nur getestet werden, ob eine bestimmte Substanz an den Rezeptoren bindet, so läßt sich dies schnell und einfach mit dem BIAcore-System feststellen. Zudem handelt es sich bei dem BIAcore-System um ein automatisiertes System.

3.4 Einsatz der entwickelten Rezeptorassays für die Analyse von Realproben

Bisher war in den verschiedenen Assayformaten basierend auf sFLT-1 nur mit gereinigten Proteinen gelöst in Assaypuffer gearbeitet worden. Daher wurde zunächst der Einfluß untersucht, den das Medium bzw. der Zellkulturüberstand auf die verschiedenen Assays haben könnte. Da es sich bei den zu untersuchenden Proben um Zellkulturüberstände, wie in Kapitel II.2.1.2 beschrieben, handelte, wurde untersucht, welchen Einfluß das serumfreie Medium SF900II und Inhalte des Zellkulturüberstandes haben könnten.

Als Kontrolle diente der Überstand von Kulturproben einer FGF-9 (fibroblast growth factor-9) Fermentation unter äquivalenten Bedingungen. Bei FGF-9 handelte es sich um einen Wachstumsfaktor, der keine Affinität zu sFLT-1 aufwies. Es wurden VEGF-Standardreihen in Assaypuffer, SF900 II und FGF-9-haltigem Zellkulturüberstand angesetzt und vermessen. Der in Abbildung C für die Bestimmung von rhVEGF₁₆₅ mit den Rezeptorassay im Sandwichformat dargestellte Effekt wurde bei allen Formaten beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die Vielzahl und die hohe Konzentration verschiedener Proteine und anderer Substanzen liefern, die sich im Überstand befanden und miteinander interagierten.

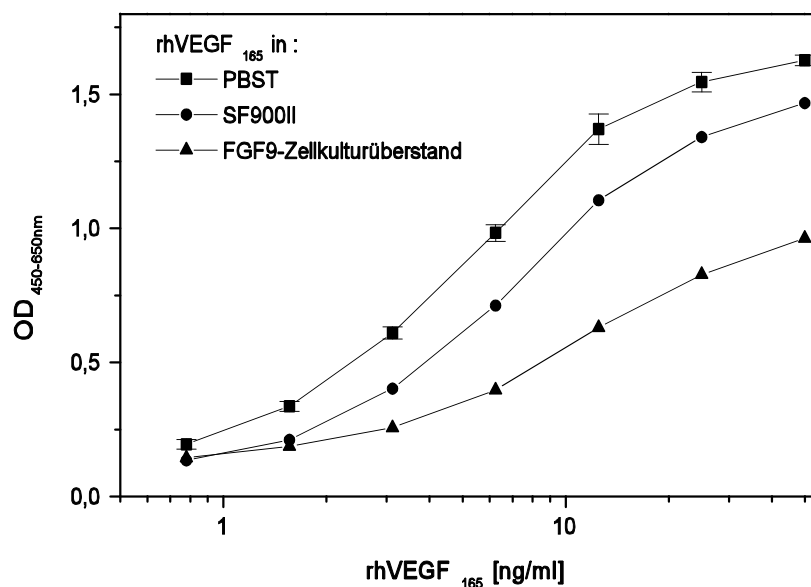


Abb. 46: Einfluß des SF900II Mediums bzw. des Zellkulturüberstandes auf den Verlauf der rhVEGF₁₆₅-Standardreihe.

Bereits eine 1 : 2 Verdünnung des Mediums bzw. des Zellkulturüberstandes mit dem Assaypuffer führte zur Aufhebung des Effektes in den Mikrotiterplattenassays. Im BIAcore-System konnte dieser Effekt ab einer 1 :10 Verdünnung nicht mehr beobachtet werden. Für die Messungen mit dem BIAcore-System wurden die Überstände bzw. Proben filtriert, um ein Verstopfen des Fließsystems zu verhindern (Kap. III.2.7.2). Bei der Bestimmung weiterer Realproben wurde der Effekt des jeweils verwendeten Mediums bzw. des VEGF freien Zellkulturüberstandes erneut kontrolliert.

Ebenfalls untersucht wurde, ob es in antikörperfreien Formaten notwendig war, sowohl eine Standardreihe mit rhVEGF₁₆₅ als auch mit rmVEGF₁₆₄ aufzunehmen. Direkte Vergleichsmessungen haben gezeigt, daß humanes und murines VEGF von sFLT-1 gleichermassen erkannt wurden (Johanson 1999). Für die Bestimmung von rhVEGF₁₂₁ war allerdings eine zusätzliche Standardreihe notwendig. Aufgrund seiner Struktur hatte diese Isoform eine geringere Affinität zu sFLT-1 als rhVEGF₁₆₅ (Kap. IV.2.2). Im Sandwichformat lagen die Werte der Standardkurve für rhVEGF₁₂₁ deutlich unter denen von rhVEGF₁₆₅ und die Steigung der Geraden durch den linearen Bereich war geringer.

In Zusammenarbeit mit M. Johanson wurden Überstände aus verschiedenen VEGF-Produktionen, von Dr. H. Weich zur Verfügung gestellt, vermessen. Um ein möglichst breites Probenspektrum abzudecken, wurden neben rhVEGF₁₆₅- auch rmVEGF₁₆₄- und rhVEGF₁₂₁-Überstände untersucht. Bei allen Proben handelte es sich um VEGF, das in Insektenzellen mit dem Baculovirus Expressionssystem rekombinant hergestellt worden war (Kap. III.2.1.2). Die Herstellung erfolgte serumfrei mit SF900II Medium. Zum Vergleich wurde der kommerziell erhältliche Quantikine Assay, ein Antikörper-Sandwichassay, herangezogen (Kap. III.2.6.5). Mit diesem Assay konnte ausschließlich humanes VEGF bestimmt werden.

Die rhVEGF₁₂₁-Konzentration konnte nur mit dem Rezeptorassay im Sandwichformat und mit dem Quantikine Assay von R&D-Systems bestimmt werden (Tab. 16). Bei den übrigen Formaten lag die vorhandene VEGF-Menge unterhalb der Nachweisgrenze (Tab. 15, Kap. IV.3.3). Die Bestimmung der rhVEGF₁₆₅- bzw. rmVEGF₁₆₄-Konzentration in den restlichen Überständen führte in allen Assayformaten zu ähnlichen Ergebnissen (Tab. 16). Wie sich gezeigt hat, kann die Verwendung des Rezeptorassays im Sandwichformat aufgrund der größeren Sensitivität von Vorteil sein. Daher wurde überwiegend dieses Format für die Untersuchung weiterer Realproben eingesetzt.

Tab. 16: Bestimmung verschiedener Zellkulturproben

Probe	Format			
	kompetitiver Assay [$\mu\text{g/ml}$]	Sandwichas- say [$\mu\text{g/ml}$]	Affinitätssen- sor [$\mu\text{g/ml}$]	Quantikine Assay [$\mu\text{g/ml}$]
rmVEGF ₁₆₄ (11/97)	32 - 41	38 - 42	33 - 36	-
rmVEGF ₁₆₄ (9/97)	23 - 25	25 - 28	26 - 30	-
rhVEGF ₁₆₅ (2/97)	5 - 7	4 - 5	11	4,6
rhVEGF ₁₂₁ (7/94)	-	0,2 - 0,28	-	0,17

In Kooperation mit Dr. J. d. v. Heuvel und K. Eckert wurden verschiedene Hochzell-dichtefermentationen mit dem Hefeexpressionssystem *Pichia pastoris* untersucht, um die optimalen Bedingungen für die Genexpression von rhVEGF₁₆₅ zu finden (Kap. III.2.10.2, d. v. Heuvel, unveröffentlichte Ergebnisse). *Pichia pastoris* ist als Hefe schneller, einfacher und billiger in der Anwendung als andere eukaryotische Expressionssysteme wie z.B. das Baculovirussystem. Zudem haben Hefen den Vorteil, daß sie Proteine sekretieren können und somit die Aufarbeitung und Reinigung des Proteins vereinfacht wird (Eckert 1998). Bei dem verwendeten *Pichia*-Mut^S-Stamm wird die VEGF-Expression durch Methanol als Kohlenstoffquelle induziert (Kap. III.2.9.2). Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Rezeptorassays wurde der Verlauf der rhVEGF₁₆₅-Konzentration während der Fermentation bestimmt. Die optische Dichte, der Glycerin- und Methanolgehalt zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentation wurden von S. Marten und K. Eckert untersucht (Kap. III.2.9.2). Die pO₂-Werte wurden on-line erfaßt.

In den nachfolgenden Abbildungen 47 bis 49 sind der Verlauf der rhVEGF₁₆₅-, Glycerin- und Methanolkonzentration sowie die optische Dichte und der pO₂-Gehalt während der Fermentation dargestellt. In den Abbildung 47 und 48 ist deutlich zu sehen, wie in der Batch-Phase mit der Abnahme der Glycerin-Konzentration die optische Dichte und somit die Zellzahl anstieg. Während des Zellwachstums wurde Sauerstoff verbraucht. Als nach 20 Stunden der pO₂-Wert wieder anstieg, war das ein Zeichen dafür, daß sich das Zellwachstum verlangsamte, da die vorgelegte Kohlenstoffquelle erschöpft war. In der Glycerin-Fed-Batch-Phase wurde die Zelldichte über eine Glycerin

limitierte Fütterung weiter erhöht bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 185$ (Abb. 47 und 48). In der Methanol-Fed-Batch-Phase wurde nur noch eine schwache Zunahme der Zelldichte auf $OD_{600} = 250$ beobachtet.

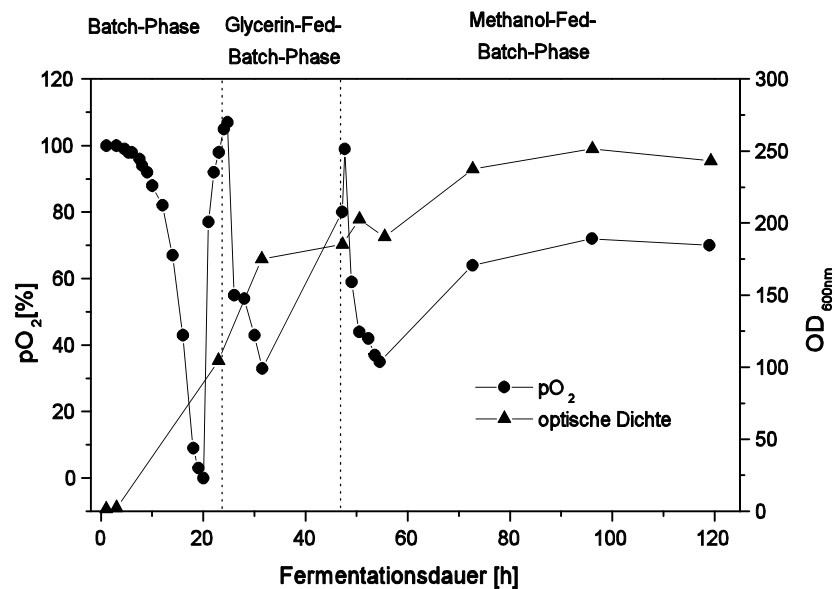


Abb. 47: Optische Dichte und pO_2 -Werte während der Fermentation (Fermentation V3P vom 16.6.1999).

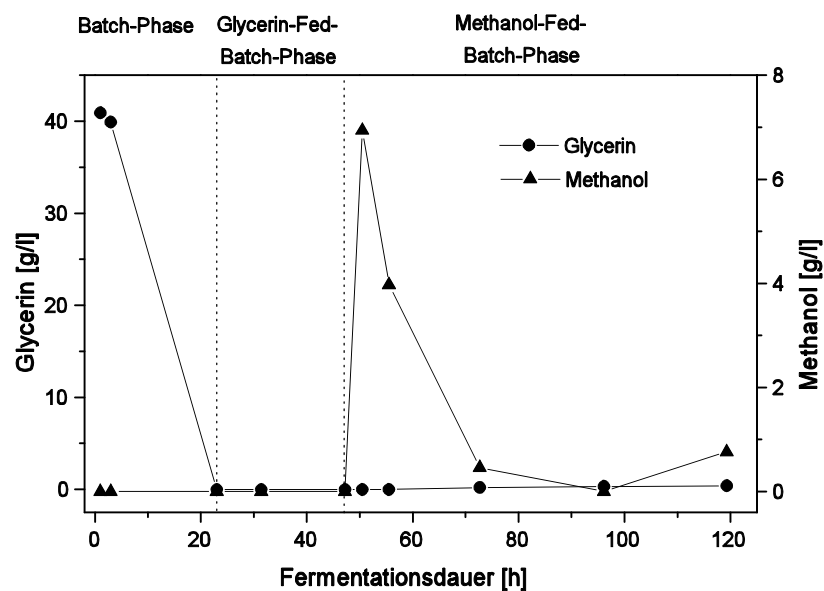


Abb. 48: Verlauf Glycerin- und Methanolkonzentration im Fermenter (Fermentation V3P vom 16.6.1999).

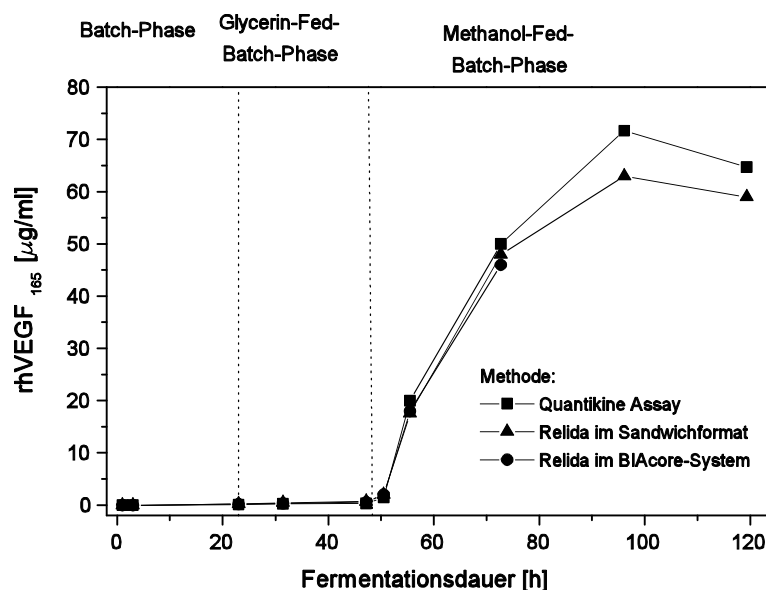


Abb. 49: Verlauf der rhVEGF₁₆₅-Konzentration während der Fermentation V3P vom 16.6.1999. Die Konzentration des Wachstumsfaktors wurde mit dem Rezeptorassay im Sandwichformat (-▲-), den BIAcore-System (-●-) und kommerziellen Quantikine Assay von R&D-Systems (-■-) bestimmt.

Mit dem Wechsel zu Methanol als Kohlenstoffquelle wurde zu Beginn der Methanol-Fed-Batch-Phase die VEGF-Genexpression ausgelöst (Abb. 48 und 49). In der Batch- und Glycerin-Fed-Batch-Phase befanden sich nur sehr geringe VEGF-Mengen bis 600 ng/ml in den Fermenterproben. Danach, in der Methanol-Fed-Batch-Phase, stieg die VEGF-Konzentration bis auf 63 bzw. 73 µg/ml an. Bis Probe 8, bei 72,7 h der Fermentation, lagen die VEGF-Werte, die mit den unterschiedlichen Methoden ermittelt wurden, eng zusammen. Bei Probe 9 und 10 (bei 96 h bzw. 119 h) ergab sich eine Differenz zwischen der VEGF-Konzentration, die mit dem Rezeptorassay und dem Quantikine Assay ermittelt wurde (Kap. III. 2.6.2, III.2.6.5). Für die letzten beiden Proben konnten keine Werte mit dem BIAcore-System angegeben werden. Zuerst waren diese Proben nicht ausreichend verdünnt und lagen daher außerhalb des linearen Meßbereichs. Als sie im Anschluß an den Meßzyklus in einer größeren Verdünnung erneut vermessen werden sollten, verstopfte das Fließsystem und machte eine Bestimmung der Proben unmöglich. Dieser Vorfall machte deutlich, daß bei der Bestimmung von Realproben mit dem BIAcore-System aufgrund des sehr kleinen Fließsystems systembedingte Probleme

auftreten können. Weitere Probleme waren die Dauer des Assays und die Aktivität der immobilisierten Rezeptorproteine auf der Sensoroberfläche und somit die Qualität des Sensors, die in Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Regenerationsschritte nachließ. Untersuchungen hatten gezeigt, daß nach 60 Regenerationen noch 80 % der Ausgangsaktivität vorhanden waren (Kap. IV.3.2). Um den Verlauf der Wachstumsfaktorkonzentration während der Fermentation zu erfassen, wurden 10 Proben in zwei bis drei Verdünnungsstufen und eine Standardreihe bestehend aus acht VEGF-Konzentrationen vermessen. Alle Werte wurden doppelt bestimmt und somit fanden 72 Anlagerungen und Regenerationen auf dem Sensor statt. Bei dieser Probenzahl war der Rezeptorassay im Sandwichformat von Vorteil. Mit ihm konnten alle Proben gleichzeitig auf einer Mikrotiterplatte bestimmt werden. Während mit dem Relida im Sandwichformat alle Proben nach 5 1/2 Stunden vermessen waren, dauerte es mit dem BIAcore-System 1 bis 1 1/2 Tage bis die letzte Probe untersucht war. Hinzu kam, daß beim Relida keine Veränderungen der Oberfläche berücksichtigt werden mußten.

Die Differenz zwischen Rezeptor- und dem Quantikine Assay könnte in dem jeweiligen Aufbau zu finden sein. Während der Relida auf den löslichen Rezeptorproteinen basierte, waren Antikörper die Grundlage für den Quantikine Assay. Möglicherweise wurden in dem kommerziellen Quantikine Assay inaktive VEGF-Proteine mit erfaßt. Daß die verwendeten löslichen Rezeptorproteine die zellulären Assays, die üblicherweise zum Nachweis biologisch aktiver Proteine genutzt werden, ersetzen können, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt (Kap. IV.2). Rezeptoren besitzen gegenüber Antikörpern meistens den Vorteil, daß sie nur aktive Proteinstrukturen erkennen. Antikörper binden oft an einem für die Aktivität irrelevanten Epitop, was zur Folge, daß auch inaktive Proteine gebunden werden können.

Allerdings war der Unterschied zwischen den Konzentrationen die mit dem Rezeptorassay und mit den Antikörper-Assay gemessen wurden nicht sehr groß. Die Abweichung betrug ca. 15 %. Da die Zellassays oft mit einem bis zu 20 %igem Fehler behaftet waren, war es nicht möglich, mit ihrer Hilfe eine Aussage darüber zu machen, welche die korrekte Konzentration der biologisch aktiven Proteine ist. In anderen Untersuchungen gab es keine weiteren Anhaltspunkte dafür, daß im Quantikine Assay auch

biologisch inaktive VEGF-Proteine bestimmt wurden. Dies führte zu der Vermutung, daß der Quantikine Assay auf einem neutralisierenden Anti-VEGF-Antikörper basieren könnte. Neutralisierende Antikörper binden an das gleiche oder an ein nahe gelegenes Epitop wie die Rezeptoren und daher erkennen sie Proteine, die sich in ihrer biologisch aktiven Konformation befinden.

Die Genexpression von rhVEGF₁₆₅ war im gewählten Expressionssystem methanolabhängig. In Gegenwart von Methanol wurde der AOX1-Promoter angeschaltet und die VEGF-Produktion in den Zellen begonnen (Kap. III.2.9.2). Somit war die Methanolkonzentration einer der Faktoren, die den größten Einfluß auf die VEGF-Expression hatten. Betrachtet man Abbildung 48, so ist zu sehen, daß die Methanolkonzentration erst stark anstieg und dann exponentiell abfiel. Die Kohlenstoffquelle wurde von den Zellen wesentlich schneller umgesetzt als erwartet. Die Methanol-Feeding-Rate war zu niedrig gewählt und Methanol wurde zu einem limitierenden Faktor. Nach 72 Stunden konnte nur noch sehr wenig und bei 96 Stunden kein Methanol im Fermenter nachgewiesen werden, d.h. das zugegebene Methanol wurde sofort von den Zellen umgesetzt. Die Methanollimitierung beeinflusste die VEGF-Produktion. Nach 72 Stunden verlangsamte sich die VEGF-Expression und nach 96 Stunden stagnierte die rhVEGF₁₆₅-Konzentration. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Fermentation abgebrochen.

In der nächsten Fermentation (V4P, 6.7.1999, v.d. Heuvel, unveröffentlichte Daten) wurde mit einer höheren Methanol-Feeding-Rate gearbeitet. In der Methanol-Fed-Batch-Phase war die Methanolkonzentration im Fermenter höher als bei der Fermentation V3P. Sie fiel zu keinem Zeitpunkt unter 1 g/l. In dieser Phase stieg die VEGF-Konzentration stetig an. Am Ende der 47-stündigen Methanol-Fed-Batch-Phase wurde mit dem Relida im Sandwichformat eine VEGF-Konzentration von 100 µg/ml im Kulturüberstand ermittelt. In der vorherigen Fermentation V3P wurde nach 72 Stunden Methanol-Fed-Batch-Phase eine Konzentration von 63 µg/ml VEGF mit dem Relida im Sandwichformat nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die zum Nachweis von VEGF verwendeten Assays in Kombination mit anderen analytischen Methoden eine gute Möglichkeit sind, Fermentationsprozesse zu kontrollieren und zu optimieren.

4 Fließinjektionsanalyse (FIA)

Im Rahmen dieser Arbeit sind verschiedene Rezeptorassayformate für die Bestimmung von VEGF entwickelt worden. Mit ihnen wurde eine Reihe unterschiedlicher Realproben untersucht und der Verlauf der Wachstumsfaktorkonzentration in zwei Fermentationen überwacht (Kap. IV.3.4). Im Verlauf der Arbeit hatte sich gezeigt, daß ein FIA-System eine gute Ergänzung zu den entwickelten Assayformaten sein könnte (Kap. II.4.2.3). Mit den bisher beschriebenen Methoden wurden die VEGF-Konzentrationen off-line nach der Fermentation bestimmt. Bei einer Fermentation wäre eine direkte on-line Kontrolle der Wachstumsfaktorkonzentration von Vorteil. Daß FIA-Systeme eine gute Möglichkeit darstellen, die Konzentration bestimmter Substanzen während einer Fermentation zu messen, wurde bereits mehrfach, u.a. von I. Rohm und M. Genrich, gezeigt (Rohm 1996, Genrich 1996, Freitag 1996). Eine on-line Überwachung ermöglicht es, den Einfluß bestimmter Parameter auf die Produktion des gewünschten Proteins zu erfassen und bei Bedarf während der laufenden Kultivierung zu verändern, um eine optimale Ausbeute zu erhalten.

Für den Aufbau einer VEGF-Nachweismethode in einem FIA-System (Abb. 12) wurden verschiedene Konjugate und ein biotinylierter Affinitätsreaktor benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit selber hergestellt wurden (Kap. II.4.2.3). Die Detektion des Wachstumsfaktors sollte über eine Konkurrenzreaktion zwischen dem VEGF in der Probe und einem VEGF-Biotin-Konjugat um die Bindungsstellen an einem Peroxidase markierten Bindungspartners erfolgen (Kap. II.4.2.3.3). Es wurde beschlossen, statt der löslichen Rezeptorproteine einen Anti-VEGF-Antikörper als Bindungspartner für den Wachstumsfaktor einzusetzen. Für die Konjugation und die anschließende Entwicklung des Assays wurden 1 bis 2 mg des Bindungspartners benötigt. Die Produktion und Reinigung einer ausreichenden Rezeptormenge war wesentlich teuer und aufwendiger als die der entsprechende Antikörpermenge. Hinzu kam, daß die Konjugation von Antikörpern eine Routinearbeit war, die einfach und ohne Verluste durchzuführen war. Bei den ersten Untersuchungen wurde mit den Peroxidase markierten Anti-VEGF-Antikörpern K6-POD bzw. VG76e-POD gearbeitet, die für die Relida-Entwicklung hergestellt

worden waren (Kap. III.3.1.2, II.2.2.2).

Das VEGF-Biotin-Konjugat wurde zusammen mit den markierten Antikörpern in einem Mikrotiterplattenassay getestet (Kap. III.2.2.3, III.2.9.2). Dazu wurden verschiedene VEGF-Biotin-Konzentrationen auf einer mit Streptavidin beschichteten Platte immobilisiert und mit K6-POD bzw. VG76-POD nachgewiesen. Mit beiden Antikörpern war die Detektion des gebundenen VEGF-Biotin-Konjugates möglich (Abb.50).

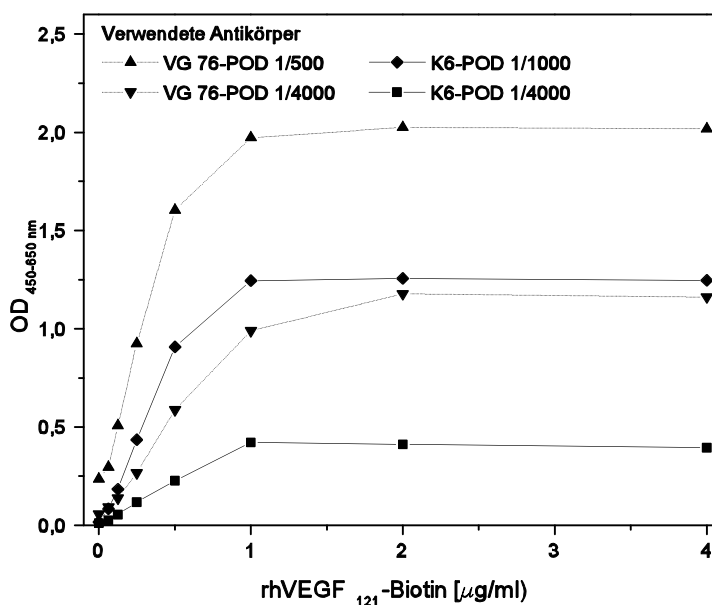


Abb. 50: Test des VEGF-Biotin-Konjugates und der Antikörperkonjugate auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte. Der Nachweis der gebundenen Konjugate erfolgte über das Peroxidasesubstrat TMB/H₂O₂.

Nachdem die benötigten Konjugate und der biotinylierte Affinitätsreaktor hergestellt und getestet waren, wurde mit dem Aufbau des Assays begonnen. Zuerst mußte ein Verhältnis von VEGF-Biotin zu K6-POD bzw. VG76-POD gefunden werden, das zu einem auswertbaren Signal in der FIA führte. Dabei durfte die Antikörperkonzentration nicht zu hoch gewählt werden, damit später die Verdrängung des VEGF-Biotin-Konjugates durch den VEGF-Standard beobachtet werden konnte. Zur Abschätzung dieses Verhältnisses wurden verschiedene VEGF-Biotin- und K6-POD- bzw. VG76-POD-Konzentrationen miteinander vorinkubiert. Um die unspezifische Bindung der Antikörper

per an die Reaktoroberfläche zu erfassen, wurden die verschiedenen Antikörperkonzentrationen nur mit Puffer inkubiert. Anschließend wurden die verschiedenen Kombinationen in das FIA-System injiziert und untersucht. Über Streptavidin wurden VEGF-Biotin und seine Komplexe mit dem markierten Antikörpern im biontinylierten Affinitätsreaktor gebunden. Durch Injektion des elektrochemischen Enzymsubstrates wurde die Konzentration der Peroxidase markierten Antikörper auf der Sensoroberfläche bestimmt. Bereits bei den ersten Untersuchungen traten Schwierigkeiten aufgrund der unspezifischen Anlagerung der Antikörperkonjugate an die Reaktoroberfläche, besonders von VG76-POD, auf. Mit Hilfe verschiedener Zusätze im Puffer wurde versucht, diesen Effekt zu reduzieren. Das beste Ergebnis wurde mit K6-POD in PBST mit 0,5% BSA (Assaypuffer 1) bzw. in PBST mit 0,5 M NaCl (Assaypuffer 2) erzielt (Abb. 51). Mit dem VG76-POD-Konjugat wurde trotz unterschiedlicher Zusätze kein auswertbares Signal-Rausch-Verhältnis erreicht. Daher wurden alle weiteren Arbeiten im FIA-System mit K6-POD und dem Assaypuffer 1 durchgeführt.

Ebenfalls untersucht wurde, ob die frei gewählte Inkubationsdauer von einer Stunde notwendig bzw. ausreichend war, um ein Gleichgewicht zwischen den Immunkomplexen zu erreichen (Gl. 4, Kap. II.4.2.3.3). Dies war notwendig, um die einzelnen Messungen in der FIA, die nacheinander stattfanden, miteinander vergleichen und auswerten zu können. In Abbildung 52, ist zu sehen, daß nach 60 Minuten das Signal nicht weiter anstieg. Die einstündige Inkubationsdauer außerhalb des FIA-Systems wurde daraufhin beibehalten.

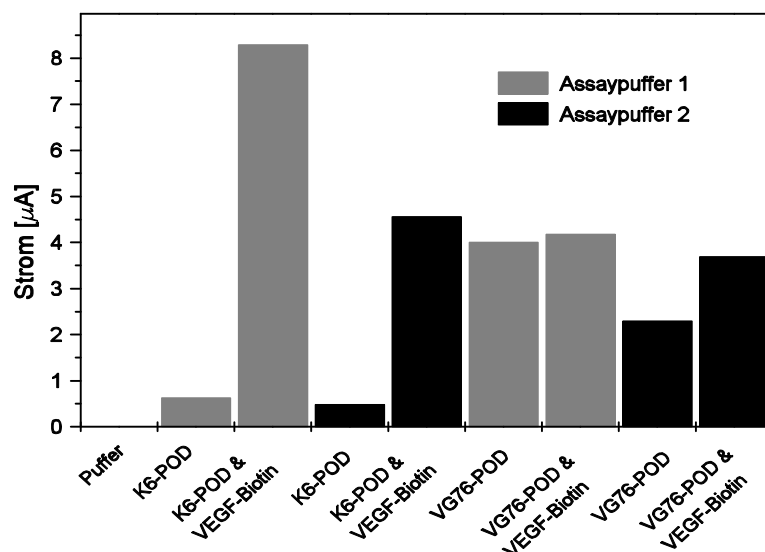


Abb. 51: Einfluß des Assaypuffers auf das Signal-Rausch-Verhältnis. Bei diesen Untersuchungen wurde das VEGF-Biotin 1 : 500, K6-POD 1 : 1000 und VG76-POD 1 : 2000 verdünnt. Die Inkubationsdauer außerhalb des FIA-Systems betrug eine Stunde bei RT.

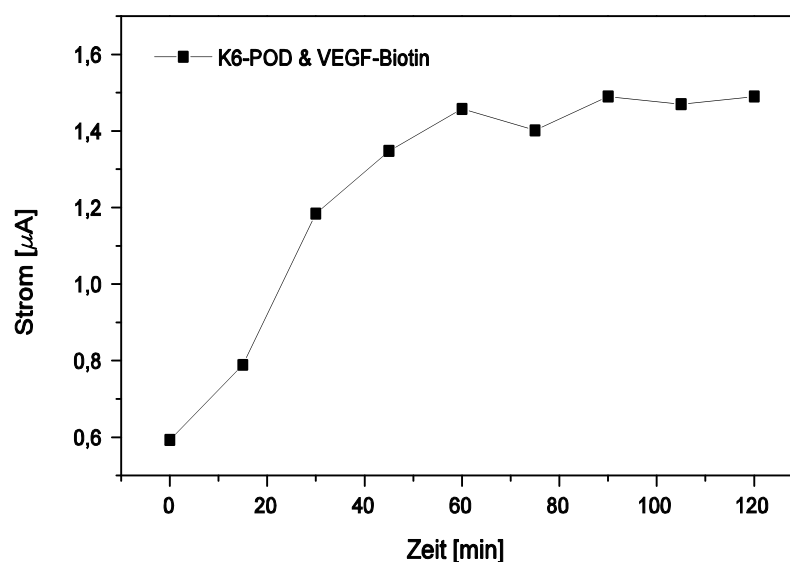


Abb. 52: Einfluß der Inkubationsdauer der Komponenten auf die Anzahl der gebildeten Komplexe und somit auf die Signalthöhe im FIA-System. Bei diesem Experiment lag die K6-POD Verdünnung bei 1 : 1500 und bei 1 : 500 bei VEGF-Biotin.

Nachdem die unspezifische Anlagerung reduziert und die benötigte Inkubationsdauer ermittelt war, wurde erneut untersucht, welche Verdünnung des VEGF-Biotin- und des K6-POD-Konjugates bei den Wettbewerbsversuchen eingesetzt werden sollten. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen beider Konjugate mit einander inkubiert und im FIA-System untersucht. Anhand dieser Untersuchungen wurde für die weiteren Experimente eine Verdünnung von 1 : 200 für VEGF-Biotin und 1 : 2000 für K6-POD gewählt. Bei den angegebenen Verdünnungen handelt es sich um die Endkonzentration der Komponenten während der gemeinsamen Inkubation. Die Wettbewerbsversuche mit rhVEGF₁₆₅-Standardreihen zeigten, daß die Bestimmung dieses Wachstumsfaktors im FIA-System möglich war (Abb. 53).

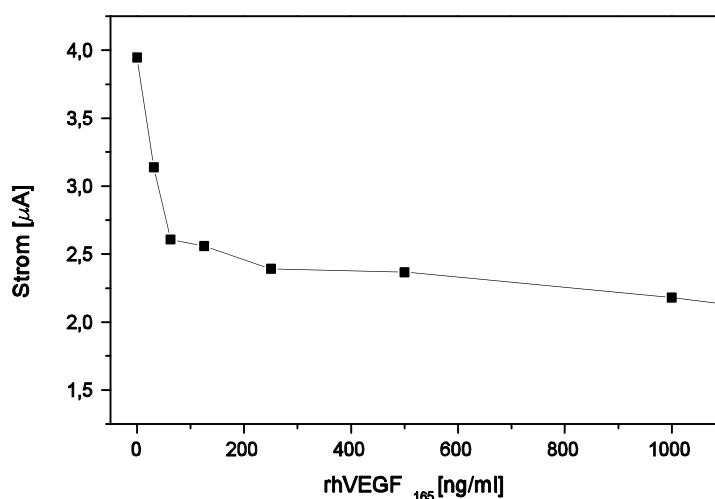


Abb. 53: Mit steigender rhVEGF₁₆₅-Konzentration wurde zunehmend das VEGF-Biotin-Konjugat (Verdünnung 1 : 200) von den Bindungsstellen des Peroxidase markierten Anti-VEGF-Antikörpers (K6-POD, 1 : 2000) verdrängt.

Eine weitere Optimierung und Charakterisierung dieser Nachweismethode war im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich. So konnte lediglich gezeigt werden, daß diese Methode prinzipiell für den Nachweis von VEGF geeignet war.

Da dieser Aufbau die Möglichkeit eröffnet, eine Methode zur on-line Überwachung der VEGF-Konzentration während der Fermentation zu entwickeln, wäre es interessant die bisherige Methode und das FIA-System weiter zu optimieren.

Bereits die Entwicklung des kompetitiven Relidas hatte gezeigt, daß es unbedingt notwendig ist, die Herstellung von Konjugaten zu optimieren und sie ggf. zu reinigen, um das Detektionslimit des Assays zu senken (Kap. IV.3.1.2). Die Vorinkubationsdauer des Assays müßte drastisch gesenkt werden, damit das FIA-System überhaupt für eine Überwachung genutzt werden kann. Werden von dem verwendeten Expressionssystem, wie beispielsweise *Pichia pastoris*, ausschließlich biologisch aktive Proteine exprimiert, so ist eine Umstellung des FIA-Systems auf die löslichen Rezeptorproteine als Fänger oder als Peroxidase markierte Detektorproteine nicht notwendig. Wie die Bestimmung der Fermenterproben in Kapitel IV.3.4 gezeigt hat, können auch auf Antikörper basierende Systeme geeignet sein, um die VEGF-Konzentration bei einer Fermentation zu überwachen. Bei Kultivierungen mit dem *E. Coli* Expressionssystem entstehen Proteine, die nicht korrekt gefaltet und damit biologisch inaktiv sind. Diese Proteine können während der Aufreinigung in ihre biologisch aktive Form überführt werden. Hier bieten die Rezeptorassays eine gute Kontrollmöglichkeit. Eine interessante Alternative wäre es, einen neutralisierenden Anti-VEGF-Antikörper zu finden, der ausschließlich biologisch-aktives Material erkennt und diesen analytisch zu nutzen. Antikörper haben den Vorteil, daß sie sich einfacher und günstiger herstellen lassen als Rezeptorproteine.

Ziel könnte eine Prozeßsteuerung über einen VEGF-Sensor in Kombination mit einem Alkoholsensor sein. Bei einem hohen Methanolverbrauch und einem schnellen Anstieg der VEGF-Produktion, wie in Kapitel IV.3.4 beschrieben, könnte über eine solche Steuerung die Methanol-Feeding-Rate automatisch erhöht und die Ausbeute verbessert werden.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich rekombinante Rezeptorproteine für den Aufbau von Nachweismethoden für biologisch aktive Wachstumsfaktoren eignen. Es wurden verschiedene nicht-radioaktive und leicht durchführbare Nachweismethoden für biologisch aktives VEGF etabliert, basierend auf den löslichen extrazellulären Domänen der VEGF-Rezeptoren. Zunächst wurde kontrolliert, ob sich die rekombinanten, löslichen Rezeptorproteine sFLT-1 und sKDR in Bezug auf die Erkennung und Bindung von Liganden äquivalent zu den vollständigen Rezeptoren der MVE-Zellen verhalten und die aufwendigen Zellassays ersetzen können. Hierzu wurden die Affinität der löslichen Rezeptoren zu rhVEGF₁₆₅, das Bindungsverhalten gegenüber anderen physiologischen Liganden und der Einfluß von Inhibitoren untersucht. Mit Ausnahme der Bindung von rhVEGF₁₂₁ zeigten die Zellassays und die Rezeptorassays eine sehr gute Übereinstimmung. Aufgrund fehlender Domänen zur Bindung an andere Elemente der zellulären Matrix war rhVEGF₁₂₁ nicht in der Lage ¹²⁵J-VEGF₁₆₅ von den Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu verdrängen. Aufgrund der anderen Oberfläche war die Bestimmung von rhVEGF₁₂₁ im Rezeptorassay möglich. Die Standardabweichungen der Rezeptorassays waren mit 10 % deutlich geringer als bei den zellulären Assays (20 %). Ein weiterer Vorteil der Rezeptorassays war, daß die beschichteten Platten gelagert werden konnten und jederzeit zur Verfügung standen.

Die Untersuchung der Affinität zwischen VEGF und sFLT-1 bzw. sKDR zeigte, daß sich vor allem sFLT-1 für den Aufbau einer sensitiven Nachweismethode eignet. Der K_D-Wert für die Bindung von VEGF an sFLT-1 lag zwischen 5 und 81 pM, was im Bereich der Literaturdaten für vollständige FLT-1-Rezeptoren liegt. Die in der Literatur beschriebene Affinität für die Bindung des Wachstumsfaktors an KDR von 75 bis 1000 pM konnte mit dem löslichen Rezeptorprotein sKDR nicht erreicht werden. Hier wurden K_D-Werte um 8 nM ermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde sFLT-1 als Grundlage für die Entwicklung nicht radioaktiver Rezeptorassays gewählt. Die Möglichkeit, sKDR zu nutzen, wurde in den verschiedenen Formaten nur daraufhin getestet, ob sie prinzi-

piell möglich wäre, um im Bedarfsfall KDR spezifische Untersuchungen durchführen zu können.

In Analogie zu bekannten Immunoassayformaten wurden verschiedene indirekte Rezeptorassays auf der Basis von Mikrotiterplatten konzipiert. So wurden eine kompetitive Nachweismethode mit einem VEGF-POD-Konjugat sowie unterschiedliche Rezeptorassays im Sandwichformat mit den entsprechenden Anti-VEGF-Antikörpern entwickelt. Sowohl mit sFLT-1 als auch mit sKDR war der Nachweis von VEGF in beiden Formaten möglich. Aufgrund der höheren Affinität und der damit verbundenen Sensitivität wurden nur die Rezeptorassays basierend auf sFLT-1 optimiert und charakterisiert. Neben diesen indirekten Formaten wurde auch das BIAcore-System als direkter Affinitätssensor verwendet, um eine VEGF-Nachweismethode zu etablieren. Bei dieser Methode konnte nur sFLT-1 als Bindungspartner genutzt werden. Messungen mit sKDR auf der Sensoroberfläche waren nicht möglich, da die KDR-VEGF-Bindung stark heparinabhängig war und Heparin nicht zusammen mit den Rezeptorproteinen auf dem Sensor fixiert werden konnte. Bei sFLT-1 traten diese Probleme aufgrund des geringeren Heparineinflusses auf die Bindung nicht auf.

Ein Vergleich der unterschiedlichen Nachweismethoden zeigte, daß mit dem Rezeptorassay im Sandwichformat die niedrigsten Detektionslimits erreicht wurden. Der IC_{50} -Wert lag zwischen 4 und 20 ng/ml. Bei den anderen Methoden war der IC_{50} -Wert um den Faktor 10 schlechter. Dafür hatten die Messungen mit dem kompetitiven Rezeptorassay und dem Affinitätssensor den Vorteil, daß humanes und murines VEGF parallel bestimmt werden konnten. Im Sandwichformat waren dafür zwei verschiedene Antikörper und die entsprechenden Standardreihen notwendig. Durch Wechsel zu einem biotinylierten Anti-VEGF-Antikörper und einem Peroxidase-Streptavidin-Konjugat sowie zu einem chemiluminiszierenden Enzymsubstrat wurde das Sandwichformat so weit verbessert, daß VEGF-Konzentrationen zwischen 100 pg/ml und 100 ng/ml bestimmt werden konnten.

Mit Hilfe der entwickelten Rezeptorassays war es möglich, den Verlauf der VEGF-Konzentration während einer Kultivierung zu verfolgen, den Einfluß verschiedener Parameter zu erfassen und die VEGF-Produktion zu optimieren. Da das verwendete Expressionssystem *Pichia pastoris* fast ausschließlich Proteine in ihrer aktiven Form exprimiert, waren die VEGF-Konzentrationen, die mit den Rezeptorassays und mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper-basierten Quantikine Assay von R&D-System gemessen wurden, ähnlich.

Da bei Kultivierungen eine on-line Überwachung der Proteinkonzentration vorteilhaft ist, wurde die Möglichkeit untersucht, ein FIA-System für den Nachweis von VEGF zu nutzen. Bei dieser Methode wurde ein Anti-VEGF-Antikörper als Bindungspartner für den Wachstumsfaktor eingesetzt. Aufgrund der langen Vorinkubation der Probe mit den Assaykomponenten kann dieses System bisher nicht für eine on-line Überwachung genutzt werden. Hier wäre eine Weiterentwicklung sinnvoll. Erst nach einer deutlichen Verkürzung der Inkubationszeit kann versucht werden, dieses FIA-System für eine on-line Überwachung zu nutzen.

Abschließend bleibt festzuhalten, daß sich die entwickelten Rezeptorassays hervorragend für die Quantifizierung von aktivem VEGF eignen. Sie können die aufwendigen, radioaktiven Zellassays nicht nur ersetzen, sondern haben auch noch einige Vorteile. So liegen die Standardabweichungen bei den nicht radioaktiven Rezeptorassays zwischen 3 und 5 %. Aufgrund der Lagerstabilität der beschichteten Platten können die Rezeptorassays auch kurzfristig durchgeführt werden.

VI Literatur

Ahrendt, G., Chickering, D., Ranieri, J. (1998) Angiogenic Growth Factors: A Review for Tissue Engineering, *Tissue engineering* 4, 117-130

Baker, P. N., Krasnow, J., Roberts, J. M., Yeo, K. (1995) Elevated Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Preeclampsia, *Obst. & Gynec.* 86, 815-821

Banks, R. E., Forbes, M. A., Searles, J., Pappin, D., Rahman, D., Kaufmann, S., Walters, C. E., Jackson, A., Eves, P., Linton, G., Keen, J., Walker, J. J., Selby, P. J. (1998) Evidence for the Existence of a Novel Pregnancy-Associated Soluble Variant of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, Flt-1, *Mol. Hum. Reprod.* 4, 377-386

Barleon, B., Totzke, F., Herzog, C., Blanke, S., Kremmer, E., Siemeister, G., Marmé, D., Martiny-Baron, G. (1997) Mapping of the Sites for Ligand Binding and Receptor Dimerization at the Extracellular Domain of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor FLT-1, *J. Biol. Chem.* 272(16), 10382-10388

Baron, D. (1994) Anwendung monoklonaler Antikörper in der Diagnostik, *Bioscope*, 20-26

Bayer, E. A., Wilchek, M. (1980) The Use of Avidin-Biotin-Complex as a Tool in Molecular Biology, *Methods Biochem. Anal.* 26, 1-45

BIAtchnology Handbook (1994)

Björquist, P., Boström, S. (1997) Determination of the Kinetic Constants of Tissue Factor/Factor VII/Factor VIIA and Antithrombin/Heparin using Surface Plasmon Resonance, *Thrombosis Research* 85, 225-236

Borgstrom, P., Hillan, K. J., Sriramaraio P., Ferrara, N. (1996) Complete Inhibition of Angiogenesis and Growth of Microtumors by Anti Vascular Endothelial Growth Factor Neutralizing Antibody: Novel Concepts of Angiostatic Therapy from Intravital Videomicroscopy, *Cancer Res.* 56, 4032-4039

Brekken, R. A., Huang, X., King, S. W., Thorpe, P.E. (1998) Vascular Endothelial Growth Factor as a Marker for Tumor Endothelium, *Cancer Res.* 10, 117-130

Brierley, R. A., Bussineau, C., Kosson, R., Melton, A., Siegel, R. S. (1989) Fermentation of Recombinant *Pichia pastoris* Expressing the Heterologous Gene: Bovine Lysozyme, *Ann. NY Acad. Sci.* 589, 350-362

Campell A. M. (1991) Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology, In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 23, Elsevier, Amsterdam/New York

Connolly, D. T. (1991) Vascular Permeability Factor: A Unique Regulator of Blood Vessel Function, J. Cell Biochem. 47, 219-223

Cornish-Brown, A. (1995) Fundamentals of Enzyme Kinetics, 1995 Portland Press Ltd., London

Cornish-Brown, A. (1995) Fundamentals in Enzyme Kinetics, Portland Press, London

Cunningham, S. A., Stephan, C. C., Arrate, M. P., Ayer K. G., Brock, T. A. (1997) Identification of the extracellular Domains of FLT-1 that mediate Ligand Interactions, Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 596-599

Davis-Smyth, T., Chen, H., Park, J., Presta, L. G., Ferrara, N. (1996) The Second Immunoglobulin-like Domain of VEGF Tyrosine Kinase Receptor FLT-1 determines Ligand Binding and may initiate Signal Transduction Cascade, EMBO J. 15(8), 4919-4927

Deshpande S. S. (1996) Enzyme Immunoassays: from Concept to Product Development, Chapman & Hall, USA

Eckert, K. (1998) Klonierung und Expressionsversuche zur Produktion von Luziferase in *Pichia pastoris*, Diplomarbeit, FH Bingen

Eriksson, U., Alitalo, K. (1999) Structure, Expression and Receptor-Binding Properties of Novel Vascular Endothelial Growth Factors, Current Topics in Microbiology and Immunology 237, 41-57

Fang Z. (1993) Flow Injection Separation and Preconcentration, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Ferrara, N., Henzel, W. J. (1989) Pituitary Follicular Cells secrete a Novel Heparin-Binding Growth Factor Specific for Vascular Endothelial Cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 161, 851-858

Ferrara, N., Houck, K. A., Jakeman, L. B., Winer, J., Leung, D. W. (1991) The Vascular Endothelial Growth Factor Family of Polypeptides, J. Cell Biochem. 47, 211-218

Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D. W. (1992) Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins, Endocr. Rev. 13, 18-32

Ferrara, N., Heinsohn, H., Walder, C., Bunting, S., Thomas, G. R. (1995) The Regulation of Blood Vessel Growth by Vascular endothelial Growth Factor, *Ann. NY Acad. Sci.* 752, 246-256

Ferrara, N. (1996) Vascular Endothelial Growth Factor, *Europ. J. Cancer* 32A, 2413-2422

Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997) The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor *Endocrine Reviews* 18(1), 4-25

Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H., Nguyen, T., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K. J., Schwall R. H. (1998) Vascular Endothelial Growth Factor is Essential for Corpus Luteum Angiogenesis, *Nature Medicine* 4(3), 336-340

Fiebich, B. L., Jaeger, B., Schoellmann, C., Weindel, K., Wilting, J., Kochs, G., Marmé, D., Hug, H., Weich H. A. (1993) Synthesis and Assembly of Functionally Active Human Vascular Endothelial Growth Factor Homodimers in Insect Cells, *Eur. J. Biochem.* 211, 19-26

Frank, R. (1992) Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support, *Tetrahedron* 48, 9217-9232

Freitag, R. (1996) Immunoanalysis and Immunosensors, *Biosensors in Analytical Biotechnology*, Acad. Press Inc., London

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and other Diseases, *Nat. Med.* 1, 27-31

Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B., Wells J. A. (1998) Requirements for Binding and Signalling of the Kinase Domain Receptor of Vascular Endothelial Growth Factor, *J. Biol. Chem.* 273(18), 11197-11204

Genrich, M. (1996) Sensorsysteme zur Überwachung und Analyse der Lactatoxidase-Produktion von *Geotrichum candidum*, Dissertation, TU Braunschweig

Gerber, H., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N. (1999) VEGF couples Hypertrophic Cartilage Remodeling, Ossification and Angiogenesis during Endochondral Bone Formation, *Nature Medicine* 5(6), 623-628

Gita-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I., Neufeld, G. (1992) The Binding of Vascular Endothelial Growth Factor to its Receptors is Dependent on Cell Surface-Associated Heparin-like Molecules, *J. Biol. Chem.* 267(9), 6093-6098

Godin, J. W. (1986) Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, Acad. Press Inc., New York

Gosling J. P. (1990) A Decade of Development in Immunoassays Methodology, Clin. Chem. 36(8), 1408-1427

Gruenwald, S., Heitz, J. (1993) Baculovirus Expression Vector System, Procedures and Methods Manual, PharMingen, San Diego, USA

Harada, K., Friedmann, M., Lopez, J. J., Wang, S. Y., Prasad, P. V., Pearlman J. D., Edelman E. R., Selke, F. W., Simons, M. (1996) Vascular Endothelial Growth Factor Administration in Chronic Myocardial ischemia, Am. J. Physiol. 270, H1791-H1802

Higgins, D. R., Cregg, J. M. (1998) *Pichia* Protocols, Human Press Totowa, New Jersey

Hock, B. (1989) Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln in Wasser, Wasser Abwasser Forschung 22, 78-84

Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. and Ferrara, N. (1992) Dual regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms, J. Biol. Chem. 276(36), 26031-26037

Hornig, C., Weich, H. A. (1999) Soluble VEGF Receptors, Angiogenesis 3, 33-39

Hunter, W. M., Greenwood, F. C. (1962) Preparation of Iodine 131 labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity, Nature 194, 495-496

Imagawa, M., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., Ishikawa, E., Niitsu, Y., Urushizaki, I., Kanazawa, R., Tachibana, S., Nakazawa, N., Ogawa, H. (1982) Characteristics and Evaluation of Antibody-Horseradish Peroxidase Conjugates prepared by using a Maleimide Compound, Glutaraldehyde, and Periodate, J. Appl. Biochem. 4, 41-57

Invitrogen (a): *Pichia* Expression Instruction Manual, Version 1.8

Invitrogen (b): Growth and Maintenance of Insect Cell Lines

Johanson, M. (1999) Development of a Receptor-based Enzyme-linked Competitive Assay for Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Master's Degree Project, University Uppsala

Jonca, F., Ortéga, N., Gleizes, P.-E., Bertrand, N., Plouët, J. (1997) Cell release of Bioactive Fibroblast Growth Factor 2 by Exon 6-encoded Sequence of Vascular Endothelial Growth Factor, J. Biol. Chem. 272(39), 24203-24209

- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, H., Chilov, D., Lahtinen, I., Kurkk, E., Saksela, O., Lalkkinnen, N., Alitalo, K. (1996) A Novel Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-C, is a Ligand for Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor Tyrosine Kinases, EMBO J. 15, 290-298
- Kaplan, J. B., Sridharan, L., Zaccardi, J. A., Dougher-Vermazen, M., Terman, B. I. (1997) Characterization of a Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-Immunoglobulin Chimera, Growth Factors 14, 243-256
- Karlsson R., Michaelsson A., Mattsson, L. (1991) Kinetic Analysis of Monoclonal Antibody-Antigen Interactions with a new Biosensor based Analytical System, J. Immun. Meth. 145, 3-15
- Karlson, R., Fägerstam, L., Nilshans, H., Persson, B. (1993) Analysis of Active Antibody Concentration. Separation of Affinity and Concentration Parameters, J. Immun. Meth. 166, 75-84
- Keller, K. (1991) Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart
- Kendall, R. L., Thomas, K. A. (1993) Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activity by an Endogenously encoded Soluble Receptor, PNAS 90, 10705-10709
- Keyt, B. A., Nyugen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N. (1996) Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Determinants for Binding KDR and FLT-1 Receptors - Generation of Receptor-selective VEGF Variants by Site directed Mutagenesis, J. Biol. Chem. 271(10), 5638-5646
- Kim, J. K., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Philips, H. S., Ferrara, N. (1993) Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Angiogenesis suppresses Tumor Growth *in vivo*, Nature 362, 841-844
- Klagsbrun, M., Soker, S. (1993) VEGF/VPF: The Angiogenesis Factor found ?, Curr. Biol. 3 (10), 699-702
- Köhler, G., Milestein, C. (1975) Continuous Cultures of Cells Secreting Antibodies of Predefined Specificity, Nature 265, 495-497
- Konno. H., Tanaka, T., Baba, M., Kanai, T., Matsumoto, K. Kamiya, K., Nakamura, S., Baba, S. (1998) Quantitative Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor in Colon Cancer, Eur. Surg. Res. 30, 273-278
- Kretschmann, E., Raether, H. (1968) Radiative Decay of non Radiative Surface Plasmons excited by Light, Z. Naturforsch. 23, 2135

Lawrence, C. R, Martin, A. S., Sambles J. R. (1992) Surface Plasmon Polariton Studies for highly absorbing Langmuir-Blodgett Films, *Thin Solid Films*. 208, 269

Löfås, S., Johnsson, B. (1990) A novel Hydrogel Matrix on Gold Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21, 1526-1528

Matsuda, H. (1967) Theory of the Steady-State Current Potentials Curves of Redox Electrodes Reactions in Hydrodynamic Voltametry. II Laminar Pipe- and Channel-Flows, *J. Electroanal. Chem.* 15, 325-336

Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.-J., Dehio, C. (1999) A Novel Vascular Endothelial Growth Factor encoded by Orf Virus, VEGF-E, mediates Angiogenesis via Signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 /FLT-1) Receptor Kinases, *EMBO J.* 2, 363-374

Migdal, M., Huppertz, B., Tessler, S. (1998) Neuropilin is a Placenta Growth Factor 2 Receptor, *J. Biol. Chem.* 273, 22272-22278

Mohns, J. (1996) Einsatz von Biosensoren in Kombination mit einer neuen Probenahme-technik in der Prozeßüberwachung und Lebensmittelanalytik, Dissertation, TU Braunschweig

Muller, Y. A., Christinger, H. W., Keyt, B. A., de Vos, A. M. (1997), The Crystal Structure of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: Multiple Copy Flexibility and Receptor binding, *Structure* 5, 1325-1338

Myszka, D. G., Morton, T. A., Doyle, M. L., Chaiken, I. M. (1997) Kinetic Analysis of a Protein Antigen-Antibody Interaction limited by Mass Transport on an Optical Sensor, *Biophys. Chem.* 64, 127-137

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltrak, Z. (1999) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptors, *FASEB* 13, 9-22

Nisonoff, G. W., Hopper, J. E., Spring, S. B. (1975) The Antibody Molecule, Acad. Press Inc., New York

Olander, J. V., Connelly, D. T., DeLarco J. E. (1991) Specific Binding of Vascular Permeability Factor to Endothelial Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1), 68-76

Olofson, B., Korplainen, E., Pepper M. S. (1998) Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B) binds to VEGF Receptor-1 and regulates Plasminogen Activity in Endothelial Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11709-11714

Olsen, S., Ruzicka, J., Hansen, E. H. (1982) Gradient Techniques in Flow Injection Analysis. Stopped Flow Measurements of the Activity of Lactate Dehydrogenase with Electronic Dilution, *Anal. Chim. Acta* 136, 101-108

Park, J. E., Keller, H.-A., Ferrara, N. (1993) The Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms (VEGF): Different Deposition into the Subepithelial Extracellular Matrix and Bioactivity of Extracellular Matrix bound VEGF, *Mol. Biol. Cell* 4, 1317-1326

Park, J. E., Chen, H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N. (1994) Placenta Growth Factor, *J. Biol. Chem.* 269(41), 25646-25654

Plouët, J., Moro, F., Bertanolli, S. Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., Bayard, F. (1997) Extracellular Cleavage of Vascular Endothelial Growth Factor 189-Amino Acid Form by Urokinase is Required for its Mitogenic Effect, *J. Biol. Chem.* 272(20), 13390-13396

Pötgens, A. J. G., Lubsen, N. H., van Altena, M. C., Vermeulen, R. Bakker, A., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J., de Waal, R. M. W. (1994) Covalent Dimerization of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Is Essential for its Biological Activity, *J. Biol. Chem.* 269(52), 32879-32885

Polzius, R. (1995) Gitterkoppler als direkter biochemischer Affinitätssensor, Dissertation, TU Braunschweig

Quinn, T. P., Peters, K. G., de Vries, C., Ferrara, N., Williams L. T. (1993) Fetal Liver Kinase 1 is a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor and is selectively expressed in Vascular Endothelium, *PNAS* 90, 7533-7537

Rehm, H. (1996) *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

R&D-Systems (a): Quantikine Human VEGF Immunoassay, Produktionsinformation

R&D-Systems (b): Anti-human VEGF Antibody Clon 26503.11, Produktinformation

Risau, W. (1997) Mechanism of Angiogenesis, *Nature* 386(17), 671-674

Rodriguez, C. R., Fei, D. T., Keyt, B., Baly, D. L (1998) A sensitive Fluorometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay that measures Vascular Endothelial Growth Factor 165 in Human Plasma, *J. Immun. Meth.* 219, 45-55

Roeckl, W., Hecht, D., Sztajer, H., Waltenberger, J., Yayon, A., Weich, H. A. (1998) Differential Binding Characteristics and Cellular Inhibition by Soluble VEGF Receptors 1 and 2, *Exp. Cell Res.* 241, 161-170

Rohm, I. (1996) Entwicklung amperometrischer Enzymsensoren in Siebdrucktechnik und ihr Einsatz mittels Mehrkanal-Fließinjektionsanalyse in der on-line Bioprozeßüberwachung, Dissertation, TU Braunschweig

Ruzicka, J., Hansen, E. H. (1975) Flow Injection Analysis Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis, *Anal. Chim. Acta* 78, 145-157

Ruzicka, J., Hansen, E. H. (1981) Flow Injection Analysis, Second Edition, John Wiley & Sons, New York

Samaniego, F., Markham, P. D., Gendelman, R., Watanabe, Y., Kao, V., Kowalski, K., Sonnabend, J. A., Pintus, A., Gallo, R. C., Ensoli, B. (1998) Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Present in Kaposi's Sacroma (KS) are induced by Inflammatory Cytokines and Synergize to Promote Vascular Permeability and KS Lesion Development, *Am. J. Path.* 152, 1433-1443

Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., Shibuya, M. (1996) Flt-1 but not KDR/FLK-1 Tyrosine Kinase is a Receptor for Placenta Growth Factor, which is related to Vascular Endothelial Growth Factor, *Cell Growth Differ.* 7, 213-221

Schindler, F. (1992) Real-Time BIA - Eine neue, Biosensor-gestützte Technologie zur Analyse von biospezifischen Wechselwirkungen in Echtzeit, *BioTec* 1, 36-43

Schlaeppli, J.-M., Siemeister, G., Weindel, K., Schnell, C., Wood, J. (1999) Characterization of a new potent in vivo Neutralizing Monoclonal Antibody to Human Endothelial Growth Factor, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 336-342

Schmidt, R. D., Gebbert, A., Kindervater, R., Krämer, P. (1991) Biosensoren zur Analytik von Pflanzenschutzmitteln in Wasser, *Z. Wasser-Abwasser-Forschung* 24, 15-20

Schuck, P., Millar, D. B., Kortt, A. A. (1998) Determination of Binding Constants by Equilibrium Titration with Circulating Sample in a Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Anal. Biochem.* 265, 79-91

Schwabe-Fehl, N. (1986) Immunoassays, *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, M1-M11

Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., Shibuya, M. (1995) A Unique Signal Transduction from FLT Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor VEGF, *Oncogene* 10, 135-147

Segel, I. H. (1975) *Enzyme kinetics*, John Wiley & Sons, New York

Selbert, S. (1992) Die Herstellung und Charakterisierung eines affinitätsgereinigten Antikörpers für den Wachstumsfaktor " Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)", Diplomarbeit, Universität Freiburg

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Peruzzi, C. A., Harvey, V. S., Dvorak, H. F. (1983) Tumor Cells secrete a Vascular Permeability Factor that promotes Accumulation of Ascites Fluid, *Science* 219, 983-985

Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A. (1990) Nucleotide Sequence and Expression of a novel Human Receptor-Type Tyrosine Kinase Gene (flt) closely related to the *fms* Family, *Oncogene* 5, 519-524

Shibuya, M., Ito, N., Claesson-Welsh, L. (1999) Structure and Function of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and -2, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 237, 60-83

Shima, D. T., Kuroki, M., Deutsch, U., Adamis, A. P., D'Amore P. A. (1996) The Mouse Gen for Vascular Endothelial Growth Factor. Genomic Structure, Definition of the Transcriptional Unit, and Characterisation of Transcriptional and Post-Transcriptional Regulatory Sequences, *J. Biol. Chem.* 271, 3877-3883

Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., Urbaniczky, C. (1991) Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance by using radiolabeled Proteins, *J. Colloid. Interface Sci.* 143, 513-526

Stiene, M., Bilitewski, U. (1995) FiaFox 2.0: New Software for Controlled On-Line Monitoring and Routine Measurement with Flow-Injection Analysis, *Proceedings of the 7th Congress on Biotechnology, Société Française de Microbiologie: Paris, 3, MEP 174*

Stiene, M. (1997) Elektrochemische Detektion von Virusinfektionen am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest, Dissertation, TU Braunschweig

Soldin, S. J. (1996) Receptor Assays in Clinical Laboratory, *Clin. Biochem.* 29(5), 439-444

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *Cell* 92, 735-745

Streitwieser, A., Heatcock, C. H. (1986) *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Stryer, L. (1990) *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg

Sun P. D., Davies D. R. (1995) The Cystine-Knot Growth Factor Superfamily, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 24, 269-291

Takeshita, S., Weir, L., Chen, D., Zheng, L. P., Riesen, R., Bauters, C., Symes, J. F., Ferrara, N., Isner, J. M. ((1996) Therapeutic Angiogenesis following Arterial Gene Transfer in a Rabbit Model of Hindlimb Ischemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227, 628-635

Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., Böhlen, P. (1992) Identification of the KDR Tyrosine Kinase as a Receptor for Vascular Endothelial Cell Growth Factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187(3), 1579-1586

Terman. B. I., Khandre, L., Dougher-Vermazan, M., Maglione, D, Lassar, N. L., Gospodarawicz, D., Persico, G., Boehlen, P., Eisinger, M. (1994) VEGF Receptor Subtypes KDR and FLT-1 show Different Sensitivities to Heparin and Placenta Growth factor, *Growth Factors* 11, 187-195

Tessler, S., Rockwell, P., Hicklin, D., Cohen, T., Levi, B.-Z., Witt L., Lemischka, I. R., Neufeld, G. (1994) Heparin Modulates the Interaction of VEGF₁₆₅ with Soluble and Cell Associated flk Receptors, *J. Biol. Chem.* 269(17), 12456-12461

Tijssen, P. (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 15, Elsevier, Amsterdam/New York

Tischer , E., Mitchell, R., Hartman, T., Silvia, M., Gospodarawicz, D., Fiddes J. C., Abraham J. A. (1991) The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor, *J. Biol. Chem.* 266, 11947-11954

Vaisman, N., Gospodaowicz, D., Neufeld, G. (1990) Characterization of the Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor, *J. Biol. Chem.* 265(32), 19461-19466

Valcarcel, M., Luque de Castro, M. D. (1987) *Flow-Injection Analysis- Principles and Applications*, Ellis Horwood Ltd., Chichester

Veikkola, T., Alitalo, K. (1999) VEGFs, Receptors and Angiogenesis, *Cancer Biology* 9, 211-220

Vollhardt, K. P. C (1988) *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin C. (1994) Different Signal Transduction Properties of KDR and FLT-1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor, *J. Biol. Chem.* 269 (43), 26988-26996

Wang, J. (1995) *Electroanalysis and Biosensors*, *Anal. Chem.* 67, 487R

Weller, M. G., (1992) Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-immunoassays (ELISAs) am Beispiel von Triazin-Herbiziden, Dissertation, TU München

Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A., Devos, A. M. (1997) Crystal Structure at 1,7 Angstrom Resolution of VEGF in Complex with Domain 2 of FLT-1 Recetor, *Cell* 91, 695-704

Wilson, M. B., Nakane, P. K (1978) *Recent Developments in the Periodate Method of Conjugation Horseradish Peroxidase (HRPO) to Antibodies, Immunofluorescent and Related Staining Techniques*, Elsevier, Amsterdam

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, D.-J., Leder, P., Ornitz D. M. (1991) Cell Surface, Heparin-like Molecules are required for binding Basic Fibroblast Growth Factor to its High Affinity Receptor, *Cell* 64, 841-848

Yamada, Y., Nezu, J., Shimane, M., Hirata, Y. (1997) Molecular Cloning of a Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-D, *Genomics* 42, 483-488

Yu, Y., van Wie, B. J., Koch, A. R., Moffett, D. F., Davis, W. C. (1998) Real-Time Analysis of Immunogen Complex Reaction Kinetics Using Surface Plasmon Resonance, *Anal. Biochem.* 263, 158-168